

Perfluordecalin-gefüllte Poly-*n*-butylcyanoacrylat- Nanokapseln als künstliche Sauerstoffträger

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

Doctor rerum naturalium

vorgelegt von

Claudia Stephan

geboren in Stuttgart

Fakultät für Chemie
Institut für Physikalische Chemie
der Universität Duisburg-Essen

2013

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2009 bis März 2013 im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Christian Mayer am Institut für Physikalische Chemie der Universität Duisburg-Essen angefertigt.

Tag der Disputation: 04.09.2013

Gutachter:	Prof. Dr. Christian Mayer
	Prof. Dr. Jochen Stefan Gutmann
Vorsitzende:	Prof. Dr. Karin Stachelscheid

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Perfluordecalin-gefüllte Poly-*n*-butylcyanoacrylat-Nanokapseln als künstliche Sauerstoffträger“

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, im April 2013

Danksagung

Meinen ganz besonderen und herzlichsten Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Christian Mayer für die Überlassung des interessanten Themas und die stets freundliche und konstruktive Diskussionsbereitschaft aussprechen.

Bei Herrn Prof. Dr. Jochen S. Gutmann möchte ich mich für die Übernahme des Korreferates recht herzlich bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Herbert de Groot, Frau Dr. Katja B. Ferenz, Frau Dipl.-Chem. Indra N. Waack, Herrn Dr. Thorsten Bramey, Herrn PD Dr. Frank Petrat und Herrn Prof. Dr. Michael Kirsch möchte ich mich vielmals für die sehr gute Kooperation, die zahlreichen Diskussionen und die gemeinsamen Tagungen mit der Physiologischen Chemie des Universitätsklinikums Essen bedanken.

Bei Herrn Dipl.-Ing. Manfred Zähres möchte ich mich für die NMR-Messungen recht herzlich bedanken. Ferner möchte ich meinen Dank Herrn Dipl.-Ing. Manfred Zähres und Herrn Dipl.-Ing. Uwe Bachorski für die technische Unterstützung aussprechen. Frau CTA Kirsten Schwark möchte ich für die Unterstützung im Labor danken.

Bei Herrn PD Dr. habil. Holger Somnitz möchte ich mich für die quantenchemischen Berechnungen recht herzlich bedanken. Herrn Dipl.-Chem. Stefan Graß vom Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Reinhard Zellner möchte ich meinen herzlichen Dank für die Raman-Messungen aussprechen.

Bei Herrn Dipl.-Ing. Smail Boukercha vom Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Matthias Epple möchte ich mich für die REM- und ESEM-Aufnahmen bedanken. Frau BTA Sabine Barnert vom Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Rolf Schubert von der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg möchte ich meinen Dank für die zahlreichen Cryo-TEM-Aufnahmen aussprechen, sowie Herrn M.Ed. Michael Bachmann vom Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Martin Bastmeyer von der Universität Karlsruhe, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), für die zahlreichen SR-SIM-Aufnahmen.

Bei allen Studentinnen und Studenten möchte ich mich recht herzlich für die fleißige, gewissenhafte und tatkräftige Unterstützung im Labor im Zuge von Praktika und Abschlussarbeiten bedanken. Für die angenehme Arbeitsatmosphäre möchte ich herzlich allen Kolleginnen und Kollegen danke sagen.

*Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems,
das gelöst werden will.*

GALILEO GALILEI

Inmitten der Schwierigkeiten liegt die Möglichkeit.

ALBERT EINSTEIN

*Nicht wie im Chaos: zerquetscht, zerstampft,
Sondern: in Harmonie verstreut,
Wo wir Ordnung in der Vielfalt wahrnehmen,
Und wo alles, voneinander abweichend, dennoch zusammenklingt.*

ALEXANDER POPE

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	X
1. Einleitung	12
2. Theoretischer Teil	13
2.1 Nanomedizin und kolloidale Wirkstoffträgersysteme	13
2.1.1 Polymertherapeutika	15
2.1.2 Nanopartikuläre Wirkstoffträgersysteme	15
2.2 Künstliche Sauerstoffträger – <i>Artificial Oxygen Carriers (AOCs)</i>	16
2.2.1 Hämoglobin-basierte künstliche Sauerstoffträger	19
2.2.2 Das PnBCA-PFD-Nanokapselsystem als künstlicher Sauerstoffträger	24
2.2.3 Fluorcarbon-/Perfluorcarbon-basierte Systeme	26
2.2.3.1 Chemische und physikalische Eigenschaften der Fluor-/Perfluorcarbone ..	26
2.2.3.2 Fluor- und Perfluorcarbone als künstliche Sauerstoffträger	27
2.3 Mechanismen der Nanokapselbildung	31
2.3.1 Der Ouzo-Effekt	31
2.3.2 Die anionische Grenzflächenpolymerisation	37
2.4 Stabilität von Nanokapseln	42
2.4.1 Agglomerationskinetik und sterische Interaktionen der PnBCA-PFD-Nanokapseln	42
2.4.2 Kinetik der Nanopartikel-Selbstaggregation	45
2.4.3 Tenside	46
2.4.3.1 Polymere Tenside	46
2.4.3.2 Adsorption von polymeren Tensiden an Grenzflächen	47
2.5 Nanokapseln in biologischer Umgebung	48
2.5.1 Physikochemischer und physiologischer Degradationsprozess von PACA-Nanokapseln	48
2.5.2 Die <i>in vivo</i> -Verteilung von PACA-Nanopartikeln nach intravenöser Verabreichung	49
2.5.3 Partikelgröße und Partikeloberfläche als elementare Kriterien für den medizinischen Einsatz	50

3.	Experimenteller Teil.....	52
3.1	Synthese und Aufreinigung der PnBCA-PFD-Nanokapseln.....	52
3.2	Anfärbung des <i>cis</i> -, <i>trans</i> -Perfluordecalin-Kerns der PnBCA-PFD-Nanokapseln ...	54
3.3	Variation, Maßstabsvergrößerung und Langzeitstabilität der PnBCA-PFD-Nanokapseln.....	55
3.4	Vorbereitung für das <i>Nanoparticle Tracking</i>	56
3.5	Viskosität und Ostwald-Viskosimetrie	58
4.	Methodenteil.....	60
4.1	Dunkelfeldmikroskopie und das <i>Nanoparticle Tracking</i>	60
4.2	PnBCA-PFD-Nanopartikel-Charakterisierung.....	63
4.2.1	SEM und ESEM.....	64
4.2.2	Cryo-TEM	66
4.2.3	UV/Vis/NIR-Spektrophotometrie	69
4.2.4	SR-SIM.....	75
4.2.5	¹⁹ F-NMR-Spektroskopie und Spektrum des Bulk-PFD	80
4.3	Analyse gelöster Gase im <i>cis</i> -, <i>trans</i> -Perfluordecalin	81
4.3.1	Mikro-Raman-Spektroskopie	81
4.3.2	Quantenchemische Berechnungen	90
4.4	Verhalten in biologischer Umgebung.....	93
4.4.1	Intravenöse Infusionen	93
4.4.2	Leberperfusionen.....	94
5.	Ergebnisse und Diskussion.....	98
5.1	Synthese der PnBCA-PFD-Nanokapseln	98
5.2	Variation der PnBCA-PFD-Nanokapselpräparation	99
5.2.1	Variation der Lösungsmittelkonzentrationen	99
5.2.1.1	Variation des Molenbruchs der organischen Phase (x_O).....	99
5.2.1.2	Variation des Molenbruchs der wässrigen Phase (x_A)	103
5.2.2	Variation des Perfluordecalin-Gehalts	105
5.2.3	Variation des Lösungsmiteleinsatzes	108
5.2.4	Tensidreduzierte Kapselpräparationen	109
5.2.5	Kapselpräparationen mit Tensiden unterschiedlicher Kettenlänge	111
5.2.6	Variation der Synthesetemperatur	113
5.3	Maßstabsvergrößerung der PnBCA-PFD-Nanokapseldispersion	115
5.4	Langzeitstabilität der PnBCA-PFD-Nanokapseldispersionen.....	118

5.5	Verhalten in biologischer Umgebung.....	131
5.5.1	Viskosität.....	131
5.5.2	Intravenöse Infusionen	134
5.5.3	Leberperfusionen.....	135
6.	Zusammenfassung.....	140
7.	Quellenverzeichnis	143
8.	Anhang	154
8.1	Chemikalien- und Geräteliste	154
8.2	Ergebnisübersichten.....	155
9.	Lebenslauf	163

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Logarithmische Längenskala zur Einordnung von Nanopartikeln nach <i>IUPAC</i> ^[8] und <i>Kreuter</i> ^[4-7] , modifiziert nach ^[3] : <i>Helmut Goesmann und Claus Feldmann</i> : Nanopartikuläre Funktionsmaterialien. Angewandte Chemie. 2010. 122. 8. 1402-1437. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.	13
Abb. 2: Übersichtsschema der wesentlichen Entwicklungen von künstlichen Sauerstoffträgern (ohne Anspruch auf Vollständigkeit).	21
Abb. 3: Räumliche Darstellung der vier Untereinheiten des Hämoglobins, nach der Strukturdatenquelle RCSB PDB (Protein Data Bank) ^[88] und modifiziert nach <i>Paoli et al.</i> ^[89]	23
Abb. 4: Räumliche Darstellung des <i>cis</i> -, <i>trans</i> -Perfluordecylins.	25
Abb. 5: Dreikomponenten-Phasendiagramm bei konstanter Temperatur und Druck, modifiziert nach <i>Vitale und Katz</i> ^[156] . Die Binodale kennzeichnet die Grenze der Mischbarkeit und repräsentiert die thermodynamischen Minima der freien Enthalpie ΔG (const. p , T) (oberhalb befindet sich das Ein-Phasengebiet). Die Spinodale entspricht der thermodynamischen Stabilitätsgrenze (unterhalb befindet sich das Zwei-Phasengebiet). Der Anteil des Wassers entspricht der Differenz aus den Massenanteil-Wertepaaren.	32
Abb. 6: Energieschema der homogenen Nukleation ^[164] , modifiziert nach <i>Rieger und Horn</i> ^[163] , ΔG_P ist die freie Energie eines Partikels mit dem Radius r (grün), ΔG_S stellt die Oberflächenenergie dar (rot), ΔG_V kennzeichnet den Verlauf der „Bulk“-Energie (blau) und r^* markiert den Radius des kritischen Nukleations-Keims.	33
Abb. 7: Modell von <i>LaMer und Dinegar</i> ^[165] zur Beschreibung von Keimbildung und Keimwachstum in der kontrollierten Partikelbildung, modifiziert nach <i>Rieger und Horn</i> ^[163]	34
Abb. 8: Schema des Flüssig-Flüssig-Nukleations-Prozesses, modifizierte Wiedergabe nach <i>Ganachaud und Katz</i> ^[157]	36
Abb. 9: Resonanzstrukturen des <i>n</i> -Butylecyanoacrylats (links) und die Bildung der festen Kapselschalen durch anionische Grenzflächenpolymerisation nach <i>Al Khouri Fallouh et al.</i> ^[30,181,182] (Mitte und rechts).	39
Abb. 10: Schema des Bildungsmechanismus von Nanokapseln und Nanosphären, modifizierte Wiedergabe nach <i>Gallardo et al.</i> ^[183]	40
Abb. 11: Eine der möglichen Energie-Abstandsfunktionen zwischen elektrostatisch-stabilisierten Partikeln (modifiziert nach Lit. ^[194,204]).	43
Abb. 12: Schematischer Aufbau der Syntheseapparatur und Fließschema der unterschiedlichen konsekutiven Stufen der PnBCA-PFD-Nanokapselherstellung anhand eines 40-fach hochskalierten Ansatzes.	53
Abb. 13: Silanisierung der in der Dunkelfeldmikroskopie verwendeten Glasoberflächen.	56
Abb. 14: Schematische Darstellung der Strahlengänge in einem Dunkelfeldmikroskop mit Kardiod-Kondensor, GL = Gestreutes Licht, modifiziert nach Lit. ^[293]	60
Abb. 15: SEM-Aufnahme eines 20-fach hochskalierten Ansatzes einer PnBCA-PFD-Nanokapseldispersion in 50.000-facher Vergrößerung (10 kV).	64

Abb. 16: ESEM-Aufnahmen einer tensidfreien <i>Pn</i> BCA-PFD-Nanokapseldispersion, links in 20.000-facher Vergrößerung und rechts in 50.000-facher Vergrößerung (20 kV).	65
Abb. 17: Cryo-TEM-Aufnahmen von einem Standardansatz einer <i>Pn</i> BCA-PFD-Nanokapseldispersion in 6.300-facher Vergrößerung. ^[307]	66
Abb. 18: Cryo-TEM-Aufnahmen mit Durchmesserangaben von einem Standardansatz einer <i>Pn</i> BCA-PFD-Nanokapseldispersion in 6.300-facher Vergrößerung. ^[307]	67
Abb. 19: Cryo-TEM-Aufnahmen von einem 40-fach hochskalierten Ansatz einer <i>Pn</i> BCA-PFD-Nanokapseldispersion in 6.300-facher Vergrößerung. ^[307]	67
Abb. 20: Cryo-TEM-Aufnahmen mit Durchmesserangaben von einem 40-fach hochskalierten Ansatz einer <i>Pn</i> BCA-PFD-Nanokapseldispersion in 6.300-facher Vergrößerung. ^[307]	68
Abb. 21: Strichformel- und räumliche Darstellung des fluorierten Fluoreszenzfarbstoffes 5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-Porphyrin.	70
Abb. 22: Absorptionsmaxima des fluorierten Fluoreszenzfarbstoffes 5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-Porphyrin in Aceton p.a. (0,00045 g T in 20 mL Aceton p.a.). .	70
Abb. 23: Absorptionsmaxima des fluorierten Fluoreszenzfarbstoffes 5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-Porphyrin in <i>cis</i> -, <i>trans</i> -Perfluordecalin (0,00040 g T in 10 mL PFD).	71
Abb. 24: Strichformel- und räumliche Darstellung des fluorierten Fluoreszenzfarbstoffes 5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-21 <i>H</i> , 23 <i>H</i> -Porphin-Palladium(II).	71
Abb. 25: Absorptionsmaxima des fluorierten Fluoreszenzfarbstoffes 5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-21 <i>H</i> , 23 <i>H</i> -Porphin-Palladium(II) in Aceton p.a. (0,00048 g PdT in 20 mL Aceton p.a.).	72
Abb. 26: Absorptionsmaxima des fluorierten Fluoreszenzfarbstoffes 5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-21 <i>H</i> , 23 <i>H</i> -Porphin-Palladium(II) in <i>cis</i> -, <i>trans</i> -Perfluordecalin (0,00043 g PdT in 10 mL PFD).	72
Abb. 27: Strichformel- und räumliche Darstellung des fluorierten Fluoreszenzfarbstoffes 5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-21 <i>H</i> , 23 <i>H</i> -Porphin-Platin(II).	73
Abb. 28: Absorptionsmaxima des fluorierten Fluoreszenzfarbstoffes 5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-21 <i>H</i> , 23 <i>H</i> -Porphin-Platin(II) in Aceton p.a. (0,00040 g PtT in 20 mL Aceton p.a.).	73
Abb. 29: Absorptionsmaxima des fluorierten Fluoreszenzfarbstoffes 5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-21 <i>H</i> , 23 <i>H</i> -Porphin-Platin(II) in <i>cis</i> -, <i>trans</i> -Perfluordecalin (0,00038 g PtT in 10 mL PFD).	74
Abb. 30: SIM-Aufnahme (Maßstabsbalken 2 µm) der angefärbten <i>Pn</i> BCA-PFD-Nanokapseln mit 5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-Porphyrin, A = Ebene des 3D-Stacks, normale 2D-Ansicht der Draufsicht, B und C = Oberflächenrenderings des 3D-Stacks (B = Draufsicht, C = Seitenansicht). ^[329]	77
Abb. 31: SIM-Aufnahme (Maßstabsbalken 5 µm) der angefärbten <i>Pn</i> BCA-PFD-Nanokapseln mit 5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-21 <i>H</i> , 23 <i>H</i> -Porphin-Palladium(II), A = Ebene des 3D-Stacks, normale 2D-Ansicht der Draufsicht, B und C = Oberflächenrenderings des 3D-Stacks (B = Draufsicht, C = Seitenansicht). ^[329]	78
Abb. 32: SIM-Aufnahme (Maßstabsbalken 2 µm) der angefärbten <i>Pn</i> BCA-PFD-Nanokapseln mit 5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-21 <i>H</i> , 23 <i>H</i> -Porphin-Platin(II), A = Ebene des	

3D-Stacks, normale 2D-Ansicht der Draufsicht, B und C = Oberflächenrenderings des 3D-Stacks (B = Draufsicht, C = Seitenansicht). ^[329]	78
Abb. 33: Auflösungsvergleich (Maßstabsbalken 1 μm) anhand einer 2D-Ebene angefärbter <i>Pn</i> BCA-PFD-Nanokapseln mit 5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-21 <i>H</i> , 23 <i>H</i> -Porphin-Platin(II): Abbildung (A) visualisiert eine Weitfeld-Fluoreszenzaufnahme, in Abbildung (B) ist der gleiche Ausschnitt als SIM-Aufnahme abgebildet und in (C) ist die Überlagerung von (A) und (B) wiedergegeben, wobei (A) rot und (B) grün dargestellt sind. ^[329]	79
Abb. 34: ^{19}F -NMR-Spektrum des uneingekapselten <i>cis</i> -, <i>trans</i> -Perfluordecals („Bulk-PFD“)	80
Abb. 35: Basislinienkorrigierte Raman-Spektren von entgastem PFD und PFD gesättigt mit Sauerstoff, Stickstoff und Kohlendioxid. Der Ausschnitt zeigt die intensitätsstärkste Bande im Bereich der CF-Schwingungen.	82
Abb. 36: Raman-Spektren von entgastem PFD und PFD gesättigt mit verschiedenen Stickstoff-Sauerstoff-Mischungsverhältnissen (in Vol.-%) im Bereich der N_2 -Valenzschwingung (links) und der O_2 -Streckschwingung (rechts). Die oberen Spektren sind basislinienkorrigiert und bezüglich der Laserleistung während der Einzelmessungen normiert. Die unteren Spektren repräsentieren jeweils die um die Referenzprobe (0 %) subtrahierten Varianten der oberen Spektren.	84
Abb. 37: Intensitätsverhältnisse der Gasanteil-abhängigen referenzkorrigierten Raman-Signale in flüssigem PFD und im Überstand. Eine Auftragung der assoziierten Signalintensitäten ist inkludiert und enthält eine lineare Anpassung, deren Steigungen und Standardfehler ebenfalls gezeigt sind ($R^2 > 0,99$). Die Fehlerbalken repräsentieren die relativen Rausch-zu-Signal-Verhältnisse (N/S), bestimmt mit der Methode des quadratischen Mittels (RMS) in dem zugrunde liegenden Wellenzahlbereich. Der Fehler des Intensitätsverhältnisses wurde in einer Fehlerfortpflanzung (nach Taylor ^[334]) unter Verwendung der N/S-Werte kalkuliert.	85
Abb. 38: Referenzkorrigierte Raman-Signale von Kohlendioxid in flüssigem PFD und im Überstand bei 100 %-iger Sättigung mit CO_2 . Das daraus bestimmte Intensitätsverhältnis und sein Fehler (Fehlerfortpflanzung) sind ebenfalls angegeben.	86
Abb. 39: Seitenansicht (links) und Draufsicht (rechts) der geometrieoptimierten Struktur (B3LYP-D3-COSMO/def2-SVP) des <i>cis</i> -Perfluordecalin- O_2 -Systems (H. Somnitz, persönliche Mitteilung ^[344]).	90
Abb. 40: Seitenansicht (links) und Draufsicht (rechts) der geometrieoptimierten Strukturen (B3LYP-D3-COSMO/def2-SVP) des <i>trans</i> -Perfluordecalin- O_2 -Systems (H. Somnitz, persönliche Mitteilung ^[344]).	91
Abb. 41: Schematische Darstellung des Rattenleberperfusionssystems. Schema von Indra N. Waack, mit freundlicher Genehmigung vom AK H. de Groot.	94
Abb. 42: Mit KH-Puffer-perfundierte Rattenleber. Es sind keine makroskopischen Veränderungen, wie z.B. Okklusionen, erkennbar. Foto von Indra N. Waack, mit freundlicher Genehmigung vom AK H. de Groot.	97
Abb. 43: Größenverteilung von einem <i>Pn</i> BCA-PFD-Nanokapsel-Standardansatz.	98
Abb. 44: Abhängigkeit zwischen dem mittleren hydrodynamischen Radius und dem Molenbruch der organischen Phase (x_{O}), Nr. 1-4 bezogen auf den Text.	100

Abb. 45: Größenhistogramm von Nanosphären und Nanokapseln einer Partikeldispersion ($x_0 = 0,2380$), analysiert mittels <i>Nanoparticle Tracking</i> und mittels Gauß-Funktionen dekonvolviert.....	101
Abb. 46: Größenhistogramm von Nanosphären und Nanokapseln einer Partikeldispersion ($x_0 = 0,2755$), analysiert mittels <i>Nanoparticle Tracking</i> und mittels Gauß-Funktionen dekonvolviert.....	101
Abb. 47: ^{19}F -NMR-Spektren zum Nachweis von PFD in unterschiedlichen Proben.....	103
Abb. 48: Abhängigkeit zwischen dem mittleren hydrodynamischen Radius und dem Molenbruch der wässrigen Phase (x_A), Nr. 1, 5-7 bezogen auf den Text.	104
Abb. 49: Mittlere hydrodynamische Radien in der Variation des Perfluordecalin-Volumens ohne Anpassung des Monomervolumens.....	105
Abb. 50: Relative Verschiebungen des ^{19}F -NMR-Signals eines 400 μL PFD-enthaltenen Ansatzes unter abwechselnder Sättigung mit Stickstoff oder Sauerstoff.....	106
Abb. 51: Mittlere hydrodynamische Radien in der Variation des Perfluordecalin-Volumens mit Anpassung des Monomervolumens.	107
Abb. 52: Mittlere hydrodynamische Radien, die aus der Variation des Lösungsmittelgemisches resultieren.	109
Abb. 53: Mittlere hydrodynamische Radien von PnBCA-PFD-Nanokapseldispersionen beim Einsatz unterschiedlicher Tensidkonzentrationen prozentual von der wässrigen Phase des Standardansatzes.	111
Abb. 54: Mittlere hydrodynamische Radien von PnBCA-PFD-Nanokapseldispersionen beim Einsatz von unterschiedlichen Tensiden.	112
Abb. 55: Relative Größenverteilungen von PnBCA-PFD-Nanopartikeldispersionen bei unterschiedlichen Synthesetemperaturen.	114
Abb. 56: Größenverteilung von einem 10-fach hochskalierten PnBCA-PFD-Nanokapsel-Ansatz.....	115
Abb. 57: Größenverteilung von einem 20-fach hochskalierten PnBCA-PFD-Nanokapsel-Ansatz.....	116
Abb. 58: Größenverteilung von einem 40-fach hochskalierten PnBCA-PFD-Nanokapsel-Ansatz.....	116
Abb. 59: Theoretisches PFD-Konzentrations-Zeit-Profil unterschiedlicher Ansatzgrößen..	117
Abb. 60: Mittlere hydrodynamische Radien bei unterschiedlichen Molenbrüchen der organischen Phase während des Langzeitstabilitätstests.....	118
Abb. 61: Mittlere hydrodynamische Radien bei ansteigendem Perfluordecalin-Anteil und unangepasster Monomermenge während des Langzeitstabilitätstests.	120
Abb. 62: Mittlere hydrodynamische Radien bei ansteigendem Perfluordecalin-Anteil und angepasster Monomermenge während des Langzeitstabilitätstests.	121
Abb. 63: Mittlere hydrodynamische Radien während des Langzeitstabilitätstests bei Variation des Lösungsmittelgemisches.	122
Abb. 64: Mittlere hydrodynamische Radien tensid-reduzierter PnBCA-PFD-Nanokapseldispersionen während des Langzeitstabilitätstests.	123
Abb. 65: Mittlere hydrodynamische Radien tensid-ausgetauschter PnBCA-PFD-Nanokapseldispersionen während des Langzeitstabilitätstests.	123

Abb. 66: Relative Größenverteilungen von einem PnBCA-PFD-Nanokapsel-Standardansatz in chronologischer Sequenz der durchgeführten Langzeitstabilitätsuntersuchung.	125
Abb. 67: Relative Größenverteilungen von einem 10-fach hochskalierten PnBCA-PFD-Nanokapsel-Ansatz in chronologischer Sequenz der durchgeführten Langzeitstabilitätsuntersuchung.	126
Abb. 68: Relative Größenverteilungen von einem 10-fach hochskalierten PnBCA-PFD-Nanokapsel-Ansatz in chronologischer Sequenz der Langzeitstabilitätsuntersuchung bei 60 °C.....	127
Abb. 69: Relative Größenverteilungen von einem 20-fach hochskalierten PnBCA-PFD-Nanokapsel-Ansatz in chronologischer Sequenz der durchgeführten Langzeitstabilitätsuntersuchung.	128
Abb. 70: Relative Größenverteilungen von einem 40-fach hochskalierten PnBCA-PFD-Nanokapsel-Ansatz in chronologischer Sequenz der durchgeführten Langzeitstabilitätsuntersuchung.	129
Abb. 71: Gegenüberstellung der Langzeitstabilität des Standardansatzes und der 10-, 20- und 40-fach hochskalierten Ansätze.	130
Abb. 72: Viskositätsbestimmungen mit dem Ostwald-Viskosimeter bei 37 °C der PnBCA-PFD-Nanokapseldispersion, verdünnt mit unterschiedlichen Volumina an KH-Puffer-Lösung (Verbindungslinien zur „Augenführung“).	131
Abb. 73: Die beiden für die intravenösen Infusionen eingesetzten 40-fach hochskalierten PnBCA-PFD-Nanokapseldispersionen.	135
Abb. 74: Relative Größenverteilung von je einer 40-fach hochskalierten PnBCA-PFD-Nanokapseldispersion (A, B), die zu einer Dispersion C zusammengeführt wurden und mit der entsprechend verdünnt die Leber perfundiert wurde.	136
Abb. 75: Relative Größenverteilungen von Perfusatproben, die zu unterschiedlichen Zeiten posthepatisch gezogen wurden.	137
Abb. 76: Die mittleren hydrodynamischen Radien vor und während der Leberperfusion....	138
Abb. 77: Relative Größenverteilungen von einer PnBCA-PFD-Nanokapsel-Perfusatprobe nach 30-minütiger Perfusion und dreiwöchiger Lagerung bei -20 °C.	139

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht der eingesetzten Detergentien, wobei a und b für die Blockanzahl des Copolymers stehen ^[210-212]	46
Tab. 2: Maximale Konzentrationen und Teilchenzahlverhältnisse gelöster Teilchen bzw. Gase in PFD-Lösung bei 25 °C	88
Tab. 3: Maximale Konzentrationen und Teilchenzahlverhältnisse gelöster Teilchen bzw. Gase in PFD-Lösung bei 20 °C (aus Raman-Daten bestimmt)	89
Tab. 4: Wechselwirkungsenergien der geometrieoptimierten Strukturen (B3LYP-D3-COSMO/def2- QZVP) von O ₂ und den <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Isomeren des Perfluordecals (H. Somnitz, persönliche Mitteilung ^[344])	92
Tab. 5: Theoretische Vergleiche der maximalen Sauerstoffsättigungen der PnBCA-PFD-Nanokapseldispersion mit humanem Vollblut und einer Formulierung von einem Sauerstoffträger der zweiten Generation (<i>Oxygent</i> [®] AF0144). Die O ₂ -Sättigungen der Dispersionen wurden anhand des enthaltenen PFD-Volumens unter Zuhilfenahme der Sauerstofflöslichkeit von 42 Vol.-% (bei 37 °C) ^[80,331] berechnet	133
Tab. 6: Chemikalienliste	154
Tab. 7: Geräteliste	155
Tab. 8: Übersicht der Ergebnisse mit Variation des Molenbruchs in der organischen Phase.	156
Tab. 9: Übersicht der Ergebnisse mit Variation des Molenbruchs in der wässrigen Phase. .	157
Tab. 10: Übersicht der Ergebnisse mit Variation der PFD-Konzentration ohne und mit angepasster Monomerkonzentration.	158
Tab. 11: Übersicht der Ergebnisse mit Absenz der Lösungsmittel.	158
Tab. 12: Übersicht der Ergebnisse mit Tensidreduzierung.	159
Tab. 13: Übersicht der Ergebnisse mit Tensidaustausch.	160
Tab. 14: Übersicht der Ergebnisse mit Variation der Temperatur.	160
Tab. 15: Übersicht der Ergebnisse mit Hochskalierung des Ansatzvolumens.	161
Tab. 16: Übersicht der Ergebnisse der intravenösen Infusionen und Leberperfusionen	162

Abkürzungsverzeichnis

ALAT	Alanin-Aminotransferase
ANT	Advanced Nanoparticle Tracking
AOCs	Artificial Oxygen Carriers
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
BSSE	Basis Set Superposition Error
Cryo-TEM	Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie
DLCA	Diffusion-limited cluster aggregation
DLVO-Theorie	Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek-Theorie
DNM	Dynamic Nanosizing Microscopy
ESEM	Environmental Scanning Electron Microscopy
FCs	Fluorocarbons
FeT	5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-21 <i>H</i> , 23 <i>H</i> -Porphyrin-Eisen(III)chlorid
Hb	Hämoglobin
HFIP	deuteriertes Hexafluorisopropanol
Hkt.	Hämatokrit
KH-Puffer	Krebs-Henseleit-Puffer
LDH	Laktatdehydrogenase
LSM	Laser Scanning Microscope
<i>n</i> BCA	<i>n</i> -Butylcyanoacrylat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
N/S	Noise to Signal
OTS	Octadecyltrichlorsilan
PACA	Polyalkylcyanoacrylat
PAL-M	Photo Activated Localization Microscopy
PdT	5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-21 <i>H</i> , 23 <i>H</i> -Porphin-Palladium(II)
PEG	Polyethylenglycol
PEO	Polyethylenoxid
PFCs	Perfluorocarbons
PFD	Perfluorodecalin

PiBCA	Poly- <i>iso</i> -butylcyanoacrylat
PLA	Polylactidsäure
PLGA	Polylactid- <i>co</i> -Glycolid
PnBCA	Poly- <i>n</i> -butylcyanoacrylat
Poly-Hb	Poly-Hämoglobin
PPO	Polypropylenoxid
PtT	5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-21 <i>H</i> , 23 <i>H</i> -Porphin-Platin(II)
RBCs	Red Blood Cells
RES	Retikuloendotheliales System
RLCA	Reaction-limited cluster aggregation
RMS	Route Mean Square
SATP	Standard Ambient Temperature and Pressure
SEM	Scanning Electron Microscopy
SR-SIM	Superresolution Structured Illumination Microscopy
STED	Stimulated Emission Depletion
T	5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-Porphyrin
WF-Mikroskopie	Weitfeld-Mikroskopie

1. Einleitung

Wenn „*Nano*“ auf „*Bio*“ trifft, so ist dieses Rendezvous vorerst eine „*Blackbox*“, die es zu dechiffrieren gilt und die beim Aufeinandertreffen mit vielen Imponderabilien verbunden ist. Weitere Forschung an den *Nano-Bio-Interaktionen* ist erforderlich, um die nanoskaligen, biophysikalisch-chemischen und physiologischen Parameter zu entschlüsseln und auf die nächst höhere Ebene zu stellen. Diese Klärung ist von Nöten, um daraus Therapeutika gezielt zu entwickeln und komplexe Krankheitsbilder besser zu verstehen. Faktisch trägt dies so zum „Erwachsenwerden“ und zur Evolution der nanoskaligen Helfer bei und ebnet darüber hinaus das Verständnis des sie umgebenden biologischen Milieus.

Künstliche Sauerstoffträger sowohl auf der Grundlage von Hämoglobin als auch auf Fluor- oder Perfluorcarbonen werden seit etwa einem halben Jahrhundert erforscht und entwickelt. Die Motivation, artifizielle Sauerstoffträger zu entwickeln, beruht im Wesentlichen darauf den Sauerstofftransport bei Blutverlusten zu maximieren und dabei eine allogene Blutgruppenunabhängigkeit zu ermöglichen. Ein Transportsystem für respiratorische Gase zu erschaffen, das sich sowohl hinsichtlich Sterilität, Lagerstabilität und Verfügbarkeit auszeichnet, ist dabei das primäre Ziel.

Diese Arbeit befasst sich mit der Syntheseoptimierung und Charakterisierung von Perfluordecalin-gefüllten Poly-*n*-butylcyanoacrylat-Nanokapseln, deren Eignung als *Gas Carrier* physiologisch relevanter Gase in biologischen Experimenten untersucht wurde. Ferner wurde die Gaslöslichkeit mit physikalischen und theoretischen Methoden qualitativ und quantitativ analysiert und die Reversibilität des Gasaustauschs validiert. Die Charakterisierung umfasst auch eine hinreichende morphologische Studie unter Einsatz moderner Techniken, wie Cryo-TEM und SR-SIM, wobei die Dicke der Kapselwände und die sphärische Gestalt dokumentiert und die Anfärbbarkeit der Kapselkerne belegt wird.

Die durchgeführten Syntheseoptimierungen ermöglichen sowohl eine Einstellbarkeit von Kapselgrößen, als auch eine Erhöhung der maximal transportierbaren Gasmenge und den Verzicht auf potentiell toxische Lösungsmittel oder Stabilisatoren. Weiterhin konnte die Synthese erfolgreich auf den halbertechnischen Maßstab skaliert werden. Dadurch konnten in kurzer Zeit ausreichende Dispersionsmengen für medizinisch-biologische Experimente bereitgestellt werden, die positiv verliefen. Ebenfalls wurden Versuche bezüglich Langzeitstabilität und thermischen Stress forciert, die eine moderate Lagerungsfähigkeit und Belastbarkeit belegen. Summa summarum stellte sich dieser Nanokapselansatz für künstliche Sauerstoffträger als prospektiv für zukünftige Weiterentwicklungen heraus.

2. Theoretischer Teil

2.1 Nanomedizin und kolloidale Wirkstoffträgersysteme

Seitdem der Nobelpreisträger Richard P. Feynman 1959 den wegweisenden Vortrag hielt, den er „There’s Plenty of Room at the Bottom“^[1] titulierte, kam es zum Fortschritt der Nanotechnologie in den unterschiedlichen Forschungsbereichen der Natur- und Ingenieurwissenschaften und der Medizin^[2]. Der Begriff „Nano“ liegt auf der metrischen Skala bei $1\text{ nm} = 10^{-9}\text{ m}$ und ist vom griechischen Ausdruck „Nanos“ für „Zwerg“ abzuleiten^[3]. Nanopartikel sind definitionsgemäß feste kolloidale Partikel, die einen Durchmesser von 10 bis 1000 nm besitzen (Abb. 1)^[4-7]; sie unterscheiden sich deutlich von ihren dreidimensional-unendlichen Festkörpern und weisen wesentliche Größenabhängigkeit der spezifischen Materialeigenschaften auf^[3]. Die Nanomaterialeigenschaften und deren -funktionalität werden durch ihre Größe und Form beeinflusst und gesteuert^[2]. Bedeutende Nanopartikelcharakteristika sind ihre geringe Größe und ihre immense Oberfläche, wobei die Nanopartikeloberfläche einen dominierenden Einfluss auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften ausübt^[3]. Phänomenale Besonderheiten der nanoskaligen Materialien, die im makromolekularen Bereich nicht vorzufinden sind, eröffnen neue Anwendungsgebiete, wie in den Segmenten Optik, Magnetismus, Elektronik und Struktur^[2].

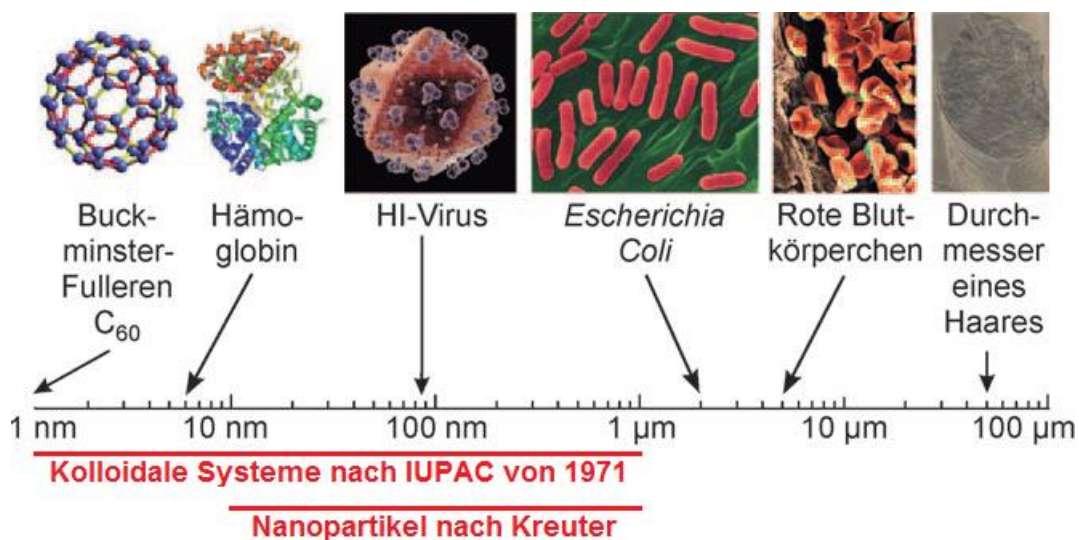


Abb. 1: Logarithmische Längenskala zur Einordnung von Nanopartikeln nach IUPAC^[8] und Kreuter^[4-7], modifiziert nach^[3]: Helmut Goesmann und Claus Feldmann: Nanopartikuläre Funktionsmaterialien. Angewandte Chemie. 2010. 122. 8. 1402-1437. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

Die medizinisch-ausgerichtete Nanotechnologie könnte die Entwicklungsschritte der personalisierten Medizin begünstigen und unterstützend Diagnostik und Bildgebung mit Therapeutika integrieren^[2,9]. Wirkstoffbeladene Nanopartikel können aufgrund von Immunsuppression und gewünschter Wirkstofffreisetzungskinetik am Zielort zu maximaler Patienten-Verträglichkeit führen; ferner zeichnen sie sich durch Unterstützung des *Drug Targeting*, für das ligandenkonjugierte Nanopartikel prädestiniert sind, aus und verfügen über erhöhte Bioverfügbarkeit und Biokompatibilität^[2,10]. Im Vergleich zu konventionellen Pharmaka wurde festgestellt, dass Nano-*Carrier* verbesserte Wirksamkeit aufweisen und zusätzlich eine dabei mögliche Absenkung der Wirkstoffdosis zu verminderten Nebenwirkungen führt^[2,11].

Die Nanotechnologie entfernt sich im Hinblick auf Arzneiformulierungen von den konventionellen „passiven Strukturen“ und bewegt sich hin zu den „aktiven Strukturen“, dies gelingt durch „smart drugs“, die durch Verbindung von spezifischen Liganden auf Aptameren oder Nano-*Carrier* zunehmend eine zielgerichtete Medikation erlauben^[2,12]. Ferner kann mittels nanoskaliger Systeme der Transport von Biomolekülen, wie von Genen, Proteinen und Stammzellen, realisiert werden^[2].

So gut nanoskalige Systeme auch zu medizinischen Zwecken genutzt werden können, so müssen deren zahlreiche Interaktionsmöglichkeiten an der Grenzfläche zu biologischen Umgebungen bedacht, untersucht und berücksichtigt werden. Nanopartikel besitzen nämlich eine große spezifische Oberfläche, an der eine Vielzahl von dynamischen biophysikochemischen Interaktionen stattfinden können; z.B. Wechselwirkungen zwischen ihrer variabel funktionalisierten Grenzfläche mit Proteinen, Membranen, Zellen, DNS und Organellen^[13,14]. Diese zum Teil biologisch verträglichen, zum Teil schädlichen Wechselwirkungen, die geprägt sind von einer großen Anzahl an Kräften, führen u.a. zur Bildung von Proteinkoronen, Zellkontakt, Partikeleinschluss an Zelloberflächen, intrazelluläre Aufnahme bzw. Endozytose und zu intrazellulären biokatalytischen Prozessen^[13]. Die chemische Materialzusammensetzung, die Oberflächenfunktionalisierung, Form und Krümmungswinkel, Porosität und Oberflächen-Kristallinität, Heterogenität, Rauigkeit und Hydrophobizität oder Hydrophilie sind die wichtigsten oberflächenbestimmenden Nanopartikelcharakteristika^[13,15,16].

Um möglichst weitverbreitete Transport-Vehikel bereitzustellen, ist eine Kombination aus ansteigender Komplexität und Minimierung der potentiellen Toxizität zu kreieren^[9,17]. Dies ist die größte Herausforderung von zunehmend leistungsfähigen Arzneistoff-Nano-*Carrier*^[9,17].

Im frühen 20. Jahrhundert brachte der Immunologe und Nobelpreisträger Paul Ehrlich das Konzept der „magic bullet“ hervor^[18,19]; durch Auftreten von verschiedenen zugelassenen Formen von *Drug Targeting*-Systemen für die Behandlung von einigen Krebsarten und schweren Infektionskrankheiten ist diese Konzeption unlängst Realität geworden und revolutionierte so die Pharmakologie^[19].

2.1.1 Polymertherapeutika

Polymertherapeutika umfassen rational gestaltete makromolekulare Arzneistoffe, Polymerarzneien, Polymer-Protein-Konjugate, Mehrkomponenten-Polyplexe für den DNS-Transport, Polymer-Arzneistoff-Konjugate und Polymermizellen mit kovalent gebundenem Arzneistoff^[17,20]. Zur Verbesserung des Arzneistoff-, Protein- oder Gentransportes sollen diese facettenreichen Konstrukte angewandt werden^[20]. Diese nanoskalige Medizin kann zugeschnittene Molekulargewichte, biomimetische Eigenschaften und sogar bioansprechbare Elemente, zielgerichtete Liganden und eine dreidimensionale Architektur hervorbringen^[20].

2.1.2 Nanopartikuläre Wirkstoffträgersysteme

Mikroemulsionen, Liposomen, Niosomen, polymerbasierte Nanopartikel und Mizellen sind die wichtigsten kolloidalen Wirkstoff-*Carrier*, die im Segment der Nanomedizin entwickelt werden^[4,17].

Liposomen umschließen einen wässrigen Kern mit einem oder mehreren Phospholipid-Bilayern; sie bilden lipidische uni- oder multilamellare Vesikel und können eine PEGylierung erfahren sowie eine zielgerichtete Ligandenoberflächenbelegung besitzen^[17].

Generell basieren Polymernanopartikel entweder auf synthetisch bioabbaubaren Polymeren oder auf natürlichen Polymeren^[17]. Bei Ersteren sind Polylactidsäure (PLA) und Polylactid-*co*-Glycolsäure (PLGA), Polyester oder Polyalkylcyanoacrylate (PACA) zu erwähnen, wobei beispielsweise Albumin zu den natürlichen Polymeren gehört^[17]. An Nanopartikel werden die zu transportierenden Wirkstoffe durch Adsorption und Absorption, Einschluss oder durch chemische Bindung gebunden^[4,7]. Zu den Matrixsystemen, in denen das Arzneimittel durchgängig in den Partikeln dispergiert vorliegt, werden die polymeren Nanosphären

eingearbeitet, die auch PEGyliert und mit zielgerichteten Liganden ausgestattet sein können^[4,17]. Polymere Nanokapseln sind Systeme, die von einer einzigen Polymermembran, die aus den gleichen Materialien wie die Nanosphären bestehen, umgeben sind und ein lipophiles oder hydrophiles Arzneimittel in einer Kavität einschließen^[4,17].

Erhöhte Stabilität weisen Nanopartikel gegenüber anderen kolloidalen Wirkstoffträgersystemen auf, insbesondere bei unterschiedlichen Verabreichungswegen in Körperflüssigkeiten^[4].

Im Jahre 1979 wurden Nanokapseln aus Polyalkylcyanoacrylat fast zeitgleich von *Florence et al.*^[21,22] und *Couvreux et al.*^[23] entwickelt^[18]. Für eine Vielzahl von pharmazeutischen Anwendungen kommen PACA-Nanokapseln infrage, wie als Bestandteil von Blutsubstituten^[24,25], bei peroralen Verabreichungen von Insulin^[26,27] oder bei der kontrollierten Freisetzung von Calcitonin^[28] oder Doxorubicin^[29] ^[18]. *Al Khouri Fallouh et al.*^[30] legten das Fundament für die PACA-Kapselherstellung^[18,31]. Verbesserte Kapselpräparationen führten zu Kapselwandstärken von unter 3 nm und schmalen Kapselgrößenverteilungen^[18,31].

In Zukunft werden wahrscheinlich Fortschritte auf Basis der Biomimetik getätigt werden, die das Entwicklungsterrain von *Carriern* wesentlich prägen werden^[19].

2.2 Künstliche Sauerstoffträger – *Artificial Oxygen Carriers (AOCs)*

Die Motivation, künstliche Sauerstoffträger zu entwickeln, entspringt aus der persistenten „Blutproblematik“. Forschungs- und Entwicklungsbestrebungen zielen auf artifizielle Sauerstoffträger, die den Mangel an Blutkonserven aufgrund von geringer Spendebereitschaft umgehen, Blutgruppenunabhängigkeit ermöglichen, Infektionsrisiko und Unverträglichkeitsreaktionen weitestgehend ausschließen und die Aussicht auf *Oxygen Carrier* Realität werden lassen, die über eine Langzeitstabilität von einigen Monaten bis zu Jahren verfügen^[32-40].

Die möglichen Anwendungsgebiete der Sauerstofftherapeutika als Nanoerythrozyten liegen vor allem in der Notfallmedizin zum partiellen Blutersatz bei Transfusionen und bei akutem starken Blutverlust bzw. hämorrhagischem Schock des Menschen oder des Tieres^[41-45]. Weiterhin könnten Blutsurrogate bei Operationen, Unfällen und Verletzungen^[46] als Erste-Hilfe-Maßnahme oder zur Prophylaxe und/oder Therapie von Organschäden durch

Ischämie/Hypoxie^[47-49] oder bei Stadien nach Reperfusion^[50,51] verwendet werden^[45]. Ferner könnten künstliche Sauerstoffträger für weitere Anwendungsgebiete infrage kommen, wie als Organprotektionslösung^[52] zur Protektion und Regeneration von isolierten Organen in der Transplantationsmedizin, in der Augenchirurgie^[53,54], zur Krebsbehandlung^[55,56], als Sauerstofflieferant bei schwerer Kohlenstoffmonoxidintoxikation^[57,58], zur Behandlung der Dekompressions- und Höhenkrankheit^[59-61] und von Lungenkrankheiten bei humanen Pränatalen^[62] und Neonatalen^[63] mithilfe der Flüssigbeatmung^[64].

Ergänzend zu diesem Anwendungsspektrum ist der Einsatz als medizinischer *Tracer* möglich, wie z.B. bei der Magnetresonanztomographie^[65-69], der Röntgenbildgebung^[70,71] und dem kontrastmittelverstärkten Ultraschall-Bildgebungsverfahren^[72].

Ein flächendeckender Einsatz bei akutem Blutverlust im zivilen und militärischen Bereich sowie eine risikolosere Behandlung von Patienten mit religiös begründeter Verneinung von Bluttransfusionen^[73-75] könnten mittels künstlicher Sauerstoffträger bewerkstelligt werden.

Die Sauerstoff-*Carrier* sollen eine angemessene Größe besitzen, so dass die Passage und Zirkulation durch das Kapillarsystem komplikationslos vonstattengehen sollten.

Im Hinblick auf die Hämodynamik sollte das Optimum der molekularen Größenordnung eines Sauerstofftransporters zwischen der des Kapillardurchmessers, um einen möglichen Gefäßverschluss zu verhindern, und der Porengröße eines Membranfilters, der für eine Sterilfiltration verwendet werden kann, liegen^[76]. *Carrier*, die kleinere Durchmesser besitzen, können aufgrund verstärkter vaskulärer Wandpermeabilität zu Begleiterscheinungen wie Hypertonie und neurologischen Störungen führen^[76].

Ein idealer künstlicher Sauerstoffträger sollte ferner die folgenden zentralen Anforderungen^[37,40,77-81] erfüllen:

1. Er sollte ein Äquivalent zum natürlichen Hämoglobin (Abb. 3) in Bezug auf den Sauerstofftransport sein.
2. Über ausreichende Sauerstofftransportkapazität verfügen, d.h. suffiziente Sauerstoffbeladung der Lungen und Sauerstofflieferung und -entladung in die Gewebe.
3. Über ein schwaches Potential verfügen, Methämoglobin zu produzieren.
4. Das Blutvolumen, den arteriellen Blutdruck und das vaskuläre Volumen aufrechterhalten, sowie über ausreichende intravaskuläre Langlebigkeit verfügen und den mikrovaskulären Blutfluss begünstigen.

5. Der osmotische und onkotische Druck sowie die Fließeigenschaften müssen denen des Blutes gleichen. Der Sauerstoffträger sollte die gleiche Viskosität wie Blut besitzen.
6. Angemessene Säure-Base-Gleichgewichte in Geweben aufrechterhalten und den arteriellen pH-Wert beibehalten.
7. Untoxisch sein (keine Nephrotoxizität besitzen), sowie möglichst rückstandslos aus dem Körper exkretiert werden können.
8. Nicht zur Überladung des retikuloendothelialen Systems führen, nicht antigenisch und nicht immunogenisch sein.
9. Nicht reaktiv mit Blutplasma und -plättchen sein, die natürlichen Blutbestandteile nicht negativ beeinflussen und Gewebe und Organe nicht irreversibel schädigen und ihre normale Funktionalität unbeeinträchtigt lassen, sowie die Regeneration von Blutbestandteilen in angemessener Geschwindigkeit zulassen.
10. Fortbestehen, Wachstum und Entwicklung eines Organismus dürfen nach einem partiellen oder totalen Blutaustausch nicht gestört, gehemmt oder sogar zum Erliegen gebracht werden.
11. Stabilität bei Raumtemperatur gewährleisten und lange Lagerbeständigkeit ermöglichen.
12. Sich durch leichte Sterilisierbarkeit, einfache Verabreichung und Handhabung, unmittelbare Verfügbarkeit, moderate Kosten und Regelkonformität der aktuellen *Good Manufacturing Practices* und Regularien der Gesundheitsbehörden auszeichnen.

Auf dem Gebiet der AOCs (*Artificial Oxygen Carriers*) werden zwei Wege beschritten: Einerseits basieren die künstlichen Sauerstoffträger auf dem Hämoglobinansatz, andererseits auf dem Ansatz partiell fluorierter oder perfluorierter Carbone.

Auf dem Gebiet der künstlichen Sauerstoffträger werden zwei Strategien zur Entwicklung injizierbarer Sauerstoff-Carrier beschritten^[73]. Diese basieren einerseits auf das in Erythrozyten enthaltene Hämoglobin (Hb), d.h. dass diese *Carrier* biomimetische Fluide sind, die auf Modifikationen dieses natürlich vorkommenden, sauerstofftragenden respiratorischen Pigments beruhen^[37,73]. Andererseits können abiotische Emulsionen Sauerstoff und Kohlendioxid lösen, die aus chemisch inerten, fluorierten (FCs) oder perfluorierten Verbindungen (PFCs) und Wasser bestehen und somit die andere Richtung repräsentieren^[37,73].

Ziel der Hb- und FC-basierten Methoden ist die Sauerstoffbereitstellung und der -transport in das Blut sowie die Kohlendioxidaufnahme und der -abtransport aus dem Blut^[37]. Gekennzeichnet sind diese zwei fundamental verschiedenen Prinzipien durch die einerseits bei biomimetischen Hb-basierten Sauerstoffträgern kovalente Bindung des Sauerstoffs zum *Carrier* und andererseits bei abiotischen FC-basierten Sauerstoffträgern der physikalisch gelöste Sauerstoff in Kavitäten innerhalb des Trägermoleküls^[37]. Sauerstoffträger auf Basis von Hb setzen auf die intrinsische Fähigkeit des Hämoglobins den molekularen Sauerstoffliganden an metallzentrierte Koordinationskomplexe reversibel zu binden^[37]. Der Fluorcarbon-Ansatz hingegen unterscheidet sich grundsätzlich davon^[37].

Die beiden Molekültypen sind trotz derselben gewünschten Funktion sehr verschieden hinsichtlich ihrer Herstellung, Struktur, chemischen Reaktivität und Biochemie^[37]. Diese Unterschiede sind ebenso vorhanden bei der Konzeption injizierbarer Formulierungen, bei den Sauerstoff- und Kohlendioxidaufnahmeprofilen und -mechanismen, den Sauerstofftransportparametern, dem *in vivo*-Verhalten und ihrer möglichen Beeinflussungen mit der „klassischen“ Physiologie^[37]. Die Rohmaterialbeschaffung, die Herstellungsverfahren und die Wirtschaftlichkeit differieren ebenfalls grundlegend^[37].

Das Forschungsziel ist nicht der Hb-Transport und die Imitation der Hb-Physiologie oder die Substitution der mannigfaltigen physiologischen Blutfunktionen, sondern die Gewebeversorgung mit Sauerstoff^[37]. Die in vielschichtiger Literatur verwendete Fehlbezeichnung „Blutsubstitut“ ist eindeutig missverständlich, denn die in Entwicklung befindlichen Produkte verfügen über einen zeitlich begrenzten Transport von ausschließlich respiratorischen Gasen, wie Sauerstoff und Kohlendioxid^[37]. In Form injizierbarer Präparate sind diese Gas-*Carrier* zur effektiven Gewebe-Sauerstoffversorgung und zum -Kohlendioxidabtransport befähigt^[37]. Keine der komplexen, vielgestaltigen und zusammenhängenden metabolischen, regulatorischen, hämostatischen und immunologischen Funktionen des natürlichen Blutes können diese Gas-Vehikel bieten^[37,79].

2.2.1 Hämoglobin-basierte künstliche Sauerstoffträger

Aufgrund der hohen renalen Toxizität des aus den Erythrozyten gewonnenen extrahierten Hämoglobins ist ein Einsatz als Infusion nicht realisierbar^[82-84]. Hb ist ein Tetramer, das aus vier Untereinheiten mit einer 2,3-Diphosphoglycerat-(2,3-DPG)-Tasche besteht (s. Abb. 3)^[85,86]. Das Tetramer ($\alpha_1\beta_1\alpha_2\beta_2$) zerbricht in die toxischen Dimere ($\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_2$),

wenn es zu einer Infusion von freiem Hb kommt, was sich hochtoxisch für die Niere auswirkt^[87] und weitere schädliche Effekte verursacht^[82].

Hb-Modifikationen sind von essentiellm Interesse, um die hervorragenden Sauerstofftransporteigenschaften des Hämoglobins zu Nutze zu machen und gleichzeitig ein Ausschluss toxischer Effekte zu realisieren^[82].

In Abb. 2 ist ein komprimierter Abriss über die bedeutenden Entwicklungsschritte der AOCs graphisch festgehalten:

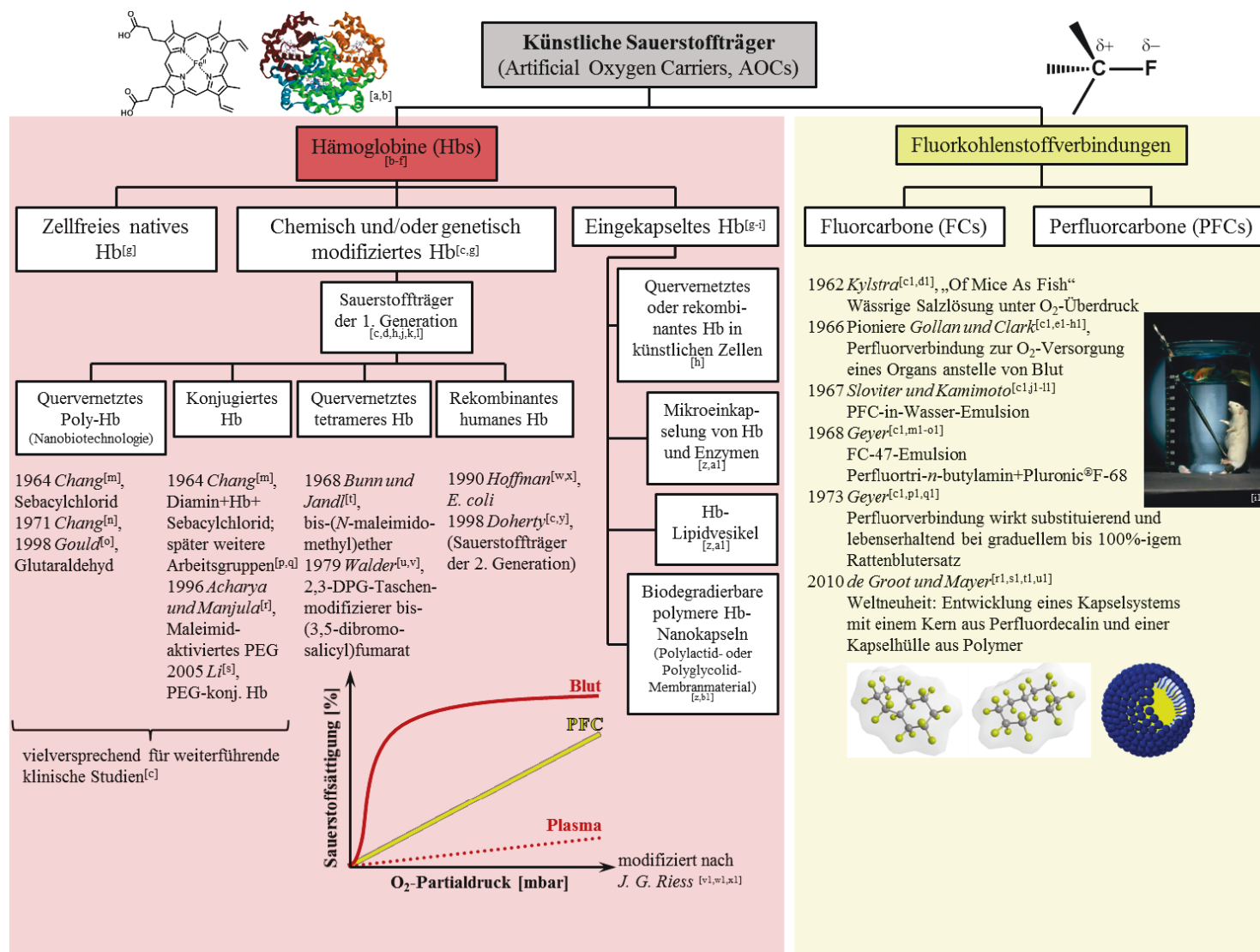


Abb. 2: Übersichtsschema der wesentlichen Entwicklungen von künstlichen Sauerstoffträgern (ohne Anspruch auf Vollständigkeit).

Quellenverweise: a^[88], b^[89], c^[82], d^[86], e^[85], f^[90], g^[37], h^[91], i^[92], j^[93], k^[94], l^[95], m^[83], n^[96], o^[43], p^[97], q^[98], r^[99], s^[100], t^[101], u^[102], v^[103], w^[104], x^[105], y^[106], z^[107], a1^[108], b1^[109], c1^[79], d1^[110], e1^[64], f1^[111], g1^[112], h1^[113], i1^[114], j1^[80], k1^[115], l1^[116], m1^[117], n1^[118], o1^[119], p1^[120], q1^[121], r1^[45], s1^[122], t1^[123], u1^[124], v1^[37], w1^[80], x1^[125].

Nanobiotechnologisch hergestelltes PolyHb wurde erstmals 1964 von *Chang*^[83] entwickelt; um Hb-Moleküle zusammen zu PolyHb zusammenzufügen verwendete er dabei bifunktionelle Agentien zur Quervernetzung der reaktiven Aminogruppen des Hämoglobins^[82]. Sebacylchlorid war das erste bifunktionelle Agens, das eingesetzt wurde^[82,83]. Das bifunktionelle Agens Glutaraldehyd wurde 1971 verwendet, um Hämoglobin quervernetzen^[82,96]. Das mit Glutaraldehyd-quervernetzte PolyHb-Verfahren wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen unabhängig, wie von *Gould et al.*^[43], angewandt^[82].

Unlösliches konjugiertes Hb wurde 1964 von *Chang*^[83] entwickelt, dabei wurde das Hämoglobin zu Polymeren quervernetzt, indem diese Prozedur bei gleichzeitiger Anwesenheit von Diamin und Hb mithilfe von Sebacylchlorid vollzogen wurde^[82]. Weitere Arbeitsgruppen entwickelten lösliches konjugiertes Hb^[82,97,98]. 1996 verwenden *Acharya und Manjula*^[99] ein Hb, das keine vasopressorischen Effekte mit seinem Hydratationswasser auslösen würde, es handelt sich hierbei um ein verbessertes Maleimid-Polyethylenglycol konjugiertes Hb^[82]. *Li et al.*^[100] haben die Entwicklung eines weiteren Typs des PEG-konjugierten Hämoglobins beschritten^[82].

Mittels des bifunktionellen Quervernetzers *bis*-(N-maleimidomethyl)ether können Hb-Moleküle intramolekular quervernetzt werden^[82]. Beispielsweise wurde vom intramolekular quervernetzten tetrameren Hb 1968 von *Bunn und Jandt*^[101] berichtet^[82]. 1979 setzten *Walder et al.*^[102,103] zur intramolekularen Quervernetzung der zwei α -Untereinheiten des Hb-Moleküls einen 2,3-DPG-Taschenmodifizierer, *bis*-(3,5-dibromosalicyl)fumarat, ein^[82].

1990 gewann *Hoffman et al.*^[104,105] ein aus *E. coli* rekombinantes humanes Hb^[82]. Durch Verbindung der zwei α -Untereinheiten eines jeden Hb-Moleküls wird die Aufspaltung in zwei Dimere verhindert und die Bildung von rekombinantem humanem Hb ausgelöst^[82]. 1998 entwickelten *Doherty et al.*^[106] die sogenannten Sauerstoffträger der zweiten Generation^[82]. Als vielversprechend zeigen sich in weiterführenden klinischen Studien das nanobiotechnologisch hergestellte PolyHb und das konjugierte Hb^[82].

Die durch Einkapselung von Hämoglobin und Enzymen^[107,108] gebildeten künstlichen roten Blutzellen (*engl. Red Blood Cells*, RBCs) ähneln den Erythrozyten stärker; dabei kann eine Modifizierung ihrer Oberflächeneigenschaften dazu führen, dass ihre Zirkulationszeit ansteigt^[91]. In künstliche Zellen kann dazu eine Einkapselung von quervernetztem Hb oder rekombinantem Hb erfolgen^[91]. Sauerstoff-Carrier im Zusammenhang künstlicher RBCs sind zu erwähnen, wie die Mikroeingkapselung von Hb und Enzymen^[107,108], Hb-Lipidvesikel^[107,108] und biodegradierbare polymere Hb-Nanokapseln^[107,109], deren Membranmaterial aus Polylactid oder Polyglycolid^[107,109] bestehen kann^[91,92].

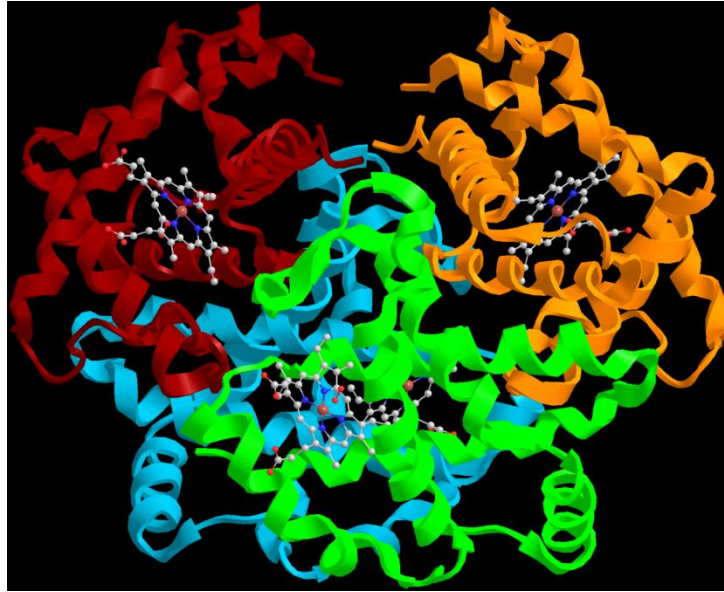


Abb. 3: Räumliche Darstellung der vier Untereinheiten des Hämoglobins, nach der Strukturdatenquelle RCSB PDB (Protein Data Bank)^[88] und modifiziert nach *Paoli et al.*^[89].

1962 brachte *Kylstra et al.*^[79,110] die Publikation „Of Mice as Fish“ heraus, worin Mäuse in wässrigen Salzlösungen unter Sauerstoffüberdruck überleben können; diese Veröffentlichung legte vermutlich den Grundstein neuer Gas-Carrier. 1966 erhielten *Gollan und Clark*^[64,111-113] bei Atmosphärendruck ein gleiches Ergebnis unter Verwendung von Perfluorverbindungen anstelle von einer wässrigen Lösung^[79]. Zur Sauerstoffversorgung eines Organs verwendeten die beiden Pioniere als erste Perfluorverbindungen^[79]. *Clark* erlangte Berühmtheit anhand von dramatischen Immersionsversuchen zur „Flüssigatmung“. In Abb. 2 ist das „Liquid Breathing“ anhand eines mit sauerstoffgesättigten flüssigen Fluorcarbons mit einer darin lebendigen Maus demonstriert, währenddessen im darüber angrenzenden Wasser schwimmende Goldfische eindrucksvoll ihre Bahnen ziehen^[114]. Eine reine Perfluorverbindung wurde 1967 von *Sloviter und Kamimoto*^[80,115,116] mit einer wasserlöslichen blutmischbaren und parenteral verabreichten PFC-in-Wasser-Emulsion der selbigen Verbindung in einem Blutplasma substituiert^[79]. Das vollständige Rattenblutvolumen wurde 1968 von *Geyer et al.*^[117-119] mit einer FC-47-Emulsion, die aus Perfluortri-*n*-butylamin und Pluronic® F-68 bestand, ersetzt^[79]. Perfluorverbindungen wirken lebenserhaltend und substituierend, dies konnte *Geyer et al.*^[120,121] 1973 demonstrieren, indem das Rattenblutvolumen graduell bis zu 100 % ausgewechselt wurde und den Tieren zum Überleben verhalf^[79]. 2010 wurde ein von *de Groot und Mayer et al.*^[45,122-124] patentiertes und nachfolgend optimiertes Nanokapselsystem entwickelt, das aus einer Poly-*n*-butylcyanoacrylat-Kapselhülle und einem Kapselkern aus *cis*-, *trans*-Perfluordecalin besteht.

2.2.2 Das PnBCA-PFD-Nanokapselsystem als künstlicher Sauerstoffträger

Fluorierte und perfluorierte Flüssigkeiten weisen sowohl Hydrophobizität als auch Lipophobizität auf, d.h. dass sie durch amphiphobe Eigenschaften gekennzeichnet sind^[37,80,125]. Ergo müssen die schwerst wasserlöslichen reinen FC- oder PFC-Verbindungen emulgiert werden, da eine intravaskuläre Applikation ausgeschlossen ist^[35,126]. Im Falle der Anwendung als unemulgierte FC- oder PFC-Verbindung würde es aufgrund des fluorophilen Charakters schnell zur Koaleszenz der FC- oder PFC-Tröpfchen kommen, was vermutlich zu schwerwiegenden Krankheitsbildern, wie Embolien, Thrombosen, Herz- und Hirninfarkten und deshalb sogar zum Tode führen könnte. Folglich wurden Überlegungen angestellt, wobei vitale, physikalisch-chemische, galenische, pharmakonvigilante und bioverfügbare Parameter im Vordergrund standen und evaluiert wurden. Beispielsweise wurden und werden perfluorierte Verbindungen als Emulsion in Erwägung gezogen, deren Stabilisierung mithilfe der Emulgatoren Pluronic®, Lecithin oder Lecithin mit Cholesterin bewältigt wird^[35]. Aufgrund einer Vielzahl von oft schwerwiegenden und lebensbedrohlichen Nebenwirkungen, ist ein Verbot des weitverbreiteten klinischen Einsatzes erwirkt worden, obwohl die Emulgierung der FCs und PFCs erfolgreich realisiert worden ist^[127].

Nova auf dem Gebiet der künstlichen Sauerstoffträger in Form von Kapseln aus vollsynthetischen Materialien mit polymeren Kapselwänden und eingekapselten flüssigen *cis*-, *trans*-Perfluorodecalin-Kern wurden von *Mayer und de Groot*^[45,122-124,127] und ihren MitarbeiterInnen evolviert und optimiert. Diese Kapselsysteme stellen Alternativen zu PFC-Emulsionen dar^[122], da sie vergleichsweise zu anderen künstlichen Sauerstoffträgern Alleinstellungsmerkmale aufweisen und das natürliche Phasenverhalten von PFCs effektiver unterbinden. Es kommt zur dauerhaften Einkapselung der PFC-Tröpfchen, dabei wird bei beiden entwickelten Kapseltypen die Problematik der Dispersionsstabilität verbessert; demnach erfolgt eine Unterbindung des Tröpfchenwachstums aufgrund von Koaleszenz oder Ostwald-Reifung^[122] durch Erschaffen einer intermediären Grenzschicht. Das Stabilitätsproblem kann durch Einsatz angemessener Tenside, die zur Verhinderung der Partikelagglomeration verwendet werden, weitestgehend gelöst werden^[122].

Bauer et al.^[122] entwickelten Nano- und Mikrokapseln basierend auf dem Emulsions-Verdampfungsprozess^[72] mit polymerer Kapselwandbildung^[128], die aus einer bioabbaubaren Poly(DL-lactid-co-glycolid)-Schale und einem flüssigen *cis*-, *trans*-Perfluorodecalin-Kern

bestehen^[122,127]. Die mechanische Stabilität dieser Nanokapselart führt zu einer guten Vergleichbarkeit mit Erythrozyten und sie könnten aufgrund ihrer geringen Größe die Scherkräfte im Blutstrom überstehen^[122,127]. Ein schneller Gasaustausch in wässriger Phase kann dennoch ermöglicht werden, da die Kapselschalen ausreichend Permeabilität aufweisen^[122,127].

Das PnBCA-PFD-Nanokapselsystem^[123] soll hier Gegenstand von allen weiteren wissenschaftlichen Betrachtungen sein, welches aus einem *cis*-, *trans*-Perfluordecalin-Kapselkern (Abb. 4) besteht der von einer Poly-*n*-butylcyanoacrylat-Kapselhülle umschlossen ist.

Conditio sine qua non sind für ein solches steriles Nanokapselsystem im Hinblick auf die Anwendung als künstliche Sauerstoffträger folgende Kriterien^[45,122,123]:

Eine reversible Sauerstoffspeicherung, die im verkapselten PFD stattfindet, eine angemessene Kapselgröße, ein schneller Gasaustausch des PFD und eine hinreichende Permeabilität der Kapselmembran für einen ausreichenden Sauerstoff- und Kohlendioxidaustausch im wässrigen Medium. Ebenso ist eine zufriedenstellende Immunsuppression, eine ausreichende Aufenthaltsdauer und eine problemlose Kapselzirkulation im Blutgefäßsystem erforderlich. Ferner ist eine zufriedenstellende mechanische Kapselstabilität und -flexibilität notwendig, um über längere Blutzirkulationszeiten intakt zu bleiben. Für das breite Anwendungsspektrum und die flächendeckende Verfügbarkeit ist die großvolumige Produktion der Nanokapseldispersion unumgänglich.

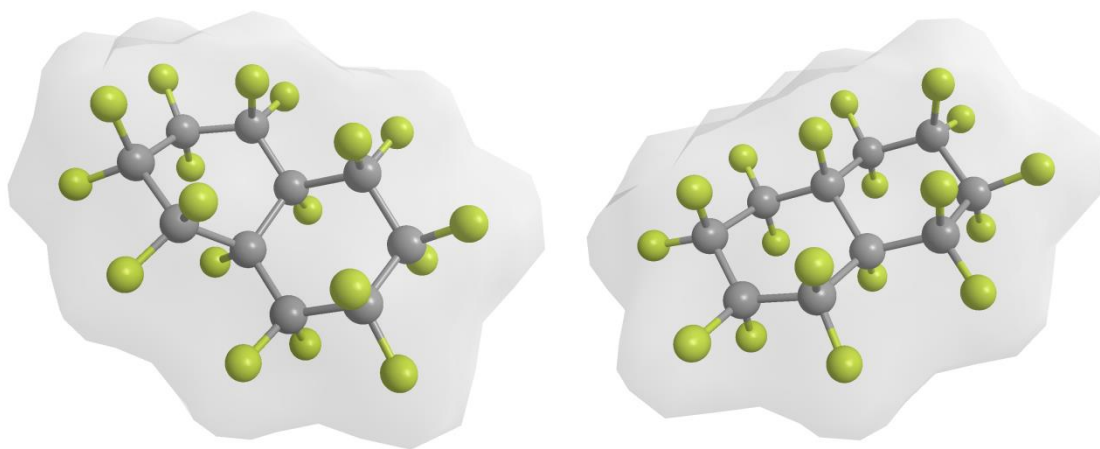


Abb. 4: Räumliche Darstellung des *cis*-, *trans*-Perfluordecalin.

2.2.3 Fluorcarbon-/Perfluorcarbon-basierte Systeme

2.2.3.1 Chemische und physikalische Eigenschaften der Fluor-/Perfluorcarbone

Fluorierte und perfluorierte Carbone bestechen durch ihre einzigartige Kombination aus den größten bekannten Gaslöslichkeiten für Flüssigkeiten mit weitestgehender chemischer und biologischer Inertheit (hinsichtlich SATP)^[37]. Die FCs und PFCs besitzen außerdem weitere besondere Eigenschaften, wie einen stark hydrophoben und lipophoben Charakter, die von der Elektronenstruktur und den räumlichen Anforderungen des Fluoratoms bzw. der stark polaren C–F-Bindung ableitbar sind^[125]. Durch Substitution der Wasserstoff- durch Fluoratome organischer Moleküle werden substanzielle Verhaltensänderungen verursacht^[37,125,129,130]. In Summe werden diese Änderungen durch die Stellung des Fluors im PSE verursacht. Durch die größte bekannte Elektronegativität werden stark polare Bindungen ausgebildet, bei denen das F-Atom einen relativ geringen Kovalenzradius einnimmt, eine schlechtere Polarisierbarkeit gegenüber dem ursprünglichen H-Substituent zeigt und die C–C-Bindungsenergie durch „schrumpfende“ Kohlenstofforbitale verstärkt^[125]. In Konsequenz schirmen Fluoratome das C–C-Skelett sterisch und elektrostatisch ab, d.h. eine Art „Scotchguard“-Effekt wird auf molekularem Niveau ausgeübt^[125]. PFCs sind daher die hydrophobsten organischen Substanzen, die jemals entdeckt wurden, was primär auf die geringe Polarisierbarkeit zurückzuführen ist^[125]. Auch strukturell unterscheiden sich Perfluoralkylketten sehr stark von vergleichbaren Ketten gewöhnlicher Kohlenwasserstoffe, da der Fluorsubstituent mehr Platz benötigt und er Kräfte auf das C–C-Skelett ausübt^[125]. Dabei wird eine eher helikale Anordnung als eine gewöhnliche planare Zickzack-Konfiguration eingenommen^[125]. PFC-Ketten sind gleichfalls auch „sperriger“ und besitzen eine größere *trans/gauche*-Energiebarriere, die sie deutlich konformationsinflexibler macht^[125].

Die extrem geringe Polarisierbarkeit des Fluors führt zu außergewöhnlich hohen Gaslöslichkeiten der PFCs^[125]. Da *van der Waals*-Wechselwirkungen direkt durch Schwankungen in der Polarität der Elektronenwolke induziert werden, bewirkt die geringe Polarisierbarkeit sehr schwache *van der Waals*-Wechselwirkungen zwischen den PFC-Molekülen^[125]. Die intermolekularen Kräfte in PFCs sind sehr schwach im Vergleich zu den starken intramolekularen Bindungen^[125]. Die *van der Waals*-Wechselwirkungen sind die einzigen intermolekularen Kräfte und halten die in Summe unpolaren Moleküle beieinander^[125]. Infolgedessen ist das Verhalten von gasähnlichen Fluiden fast dem von

flüssigen PFCs ähnlich^[125]. Substanzen von ähnlich geringer Kohäsivität, nämlich Gase, können sie leicht lösen^[125]. Auch anhand ihrer geringen Siedepunkte und ihrer hohen Flüchtigkeit relativ zu ihrem Molekulargewicht spiegelt sich die geringe Kohäsivität der PFCs wider^[125]. Ein PFC-Molekül und ein aufgenommenes Gastmolekül von ähnlicher Kohäsivität, wie beispielsweise Sauerstoff, benötigen weniger Energie um eine Kavität in einem weniger kohäsiven Material zu erzeugen^[125]. Die Löslichkeiten der respiratorischen Gase in FC- oder PFC-Flüssigkeiten bei 37 °C und 1 atm beträgt für Sauerstoff etwa 40-50 Vol.-%; die Löslichkeit für Kohlendioxid kann mehr als 200 Vol.-% betragen^[37,40,73,125,131]. Mit zunehmendem Molekulargewicht innerhalb einer homologen Reihe fällt die Sauerstofflöslichkeit; auf selbiges hat ebenso die Molekülstruktur Auswirkung^[132,133].

Fluor- und Perfluorcarbone sind passive *Gas-Carrier*, die Gase, wie bereits erwähnt, physikalisch nach dem Henry'schen Gesetz^[134] lösen^[37,80,125]. Daher besitzen Fluor- und Perfluorcarbone kein Supremum in der Sauerstoffsättigung, und bei konsequenter Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks kann der Sauerstoffgehalt den in der unteren Troposphäre übersteigen^[80,125]. Die Gesetze des Sauerstofftransports sind im Prinzip die gleichen wie die für Blutplasma zugrunde liegenden; darüber hinaus sind sie auch für den Sauerstofftransport von FC- und PFC-Emulsionen geltend^[37]. Die Sauerstofflöslichkeit in FCs und PFCs ist 20 mal größer als die von Blutplasma; in beiden Fällen ist die Löslichkeit proportional zum Sauerstoffpartialdruck^[37,135]. Das Hämoglobin hingegen zeigt einen sigmoidalen Sauerstofflöslichkeitsverlauf, der beim Erreichen des Sauerstoffpartialdrucks der Troposphäre die Sättigungsgrenze erreicht, wobei der Sauerstoff chemisch durch kovalente Bindungen an enthaltene Eisenatome gelöst wird (kooperativer Effekt)^[37,80,125].

2.2.3.2 Fluor- und Perfluorcarbone als künstliche Sauerstoffträger

Die Verwendung von synthetischen anstelle von Hämoglobin-abgeleiteten *Gas-Carriern* begründet sich einerseits darin, dass es sich hierbei um eindeutig definiertes und zuverlässiges Material handelt und andererseits, dass natürliche Produkte nicht exkludiert werden müssen, die immunologische und anderweitige Reaktionen auslösen könnten, d.h. dass diese u.a. frei von Stroma, Proteinen und Lipiden sind^[132]. Zudem sollten sterile FC- und PFC-Emulsionen, die zur parenteralen Verabreichung dienen, aus kleinen Tröpfchen mit schmalen Größenverteilungen bestehen und eine optimale Kombination aus schneller Ausatmung sowie die Herstellung stabiler Emulsionen bieten^[37,125,129,130,132,136].

Geeignete FCs und Emulgatoren müssen identifiziert werden, die sich hinsichtlich Biokompatibilität und schneller Ausscheidbarkeit auszeichnen; dies sind die Hauptschwierigkeiten bei der Produktentwicklung^[37]. In Betracht sollte die Emulsionsstabilität gegenüber der Exkretionsrate gezogen werden, d.h. dass die Halbwertszeit einer Emulsion im Körper etwa zwei bis drei Wochen nicht übersteigen sollte^[132]. Der Vorteil von FCs und PFCs ist, dass sie nicht in der Natur vorkommen und deswegen weder Rezeptoren noch physiologische Wege bekannt sind, die sie binden oder metabolisieren könnten^[37,38,137-140]. Kenntnis über die Existenz von Antigenen, die gegen FCs und PFCs fungieren, besteht nicht; eine mögliche Anwesenheit von Antigenen könnte für die Entwicklung von Infusionen von FC- oder PFC-Emulsionen ein maßgebliches Kriterium sein^[37]. Flüssige FCs und PFCs sind in Wasser schwer löslich und daher auch im Blut und anderen Körperflüssigkeiten; jedoch können sie als nano- oder mikroskalige Emulsionen in den Blutstrom injiziert werden^[40].

FCs und PFCs können ohne Auslösung von inflammatorischen Reaktionen oder Abstoßungsreaktionen über einen Zeitraum von Jahren in Organismen verbleiben^[37]. Die intravaskuläre Lebensdauer des verabreichten Produktes wird von der Phagozytose begrenzt, d.h. dass die Persistenz der Emulsionströpfchen der FC- und PFC-Emulsionen primär vom Retikuloendothelialen System (RES) einschränkt wird^[37]. Signifikante Einflussgrößen auf die intravaskuläre Verweildauer sind die Partikelgröße, die Verabreichungsdosis und die Art und Verabreichungsform des Tensids^[132]. Die Fluorcarbon-Emulsion wird anfangs in das RES aufgenommen und eine Bindung der Fluorcarbon-Moleküle an Plasmalipide erfolgt, sodann findet eine erneute Aufnahme im Blut und ein Transport in die Lungen statt, wo schlussendlich die Fluorcarbon-Moleküle exhalieren werden^[37,38,40,73,125,131]. Die pulmonale Exkretion stellt den Hauptausscheidungsweg neben der transdermalen Exkretion für FCs und PFCs dar^[79,141,142]; eine Bewertung möglicher Effekte im Hinblick auf die Physiologie der Lungen muss noch erfolgen^[37].

Ein wesentlicher Faktor bei der Auswahl des FCs/PFCs ist das Molekulargewicht, da es die Emulsionsstabilität und die Exkretion entscheidend beeinflusst^[80,125,132]. Einerseits verringert ein steigendes Molekulargewicht die Wasserlöslichkeit und den Dampfdruck, während hingegen die Lipidlöslichkeit und die Organretention im gleichen Sinne ansteigen. D.h., dass ein Kompromiss zwischen der Exkretionsfähigkeit und Emulsionsstabilität gefunden werden muss^[125]. Nach *Riess*^[132] spielen außerdem strukturelle Aspekte von FCs bzw. PFCs sowohl in der Exkretion als auch bei der Emulsionsstabilität eine große Rolle; die Exkretionsrate

steigt bei gleicher Anzahl an Kohlenstoffatomen von linearen über monozyklische, bityklische und trityklische Systeme an. Eine inverse Tendenz wurde hinsichtlich der Emulsionsstabilität gefunden, so dass dies als sogenanntes Stabilitäts- versus Exkretionsdilemma beschrieben wurde^[132]. *Clark und Moore*^[143,144] publizierten allerdings, dass ein solcher Einfluss cyclischer Strukturen auf die Ausscheidungsraten nicht nachgewiesen werden kann. Auch wenn dabei das Molekulargewicht scheinbar eine übergeordnete Bedeutung einnimmt, demonstrierte *Riess*^[125] zudem Ausnahmen, bei denen PFCs trotz ihres höheren Molekulargewichts schneller ausgeschieden werden als FCs mit gleicher C-Atomzahl, da die leicht erhöhte Lipophilität von PFCs den Transport durch zirkulierende Lipoproteine begünstigt^[125]. Die allgemeinen Trends werden also noch etwas kontrovers in der Literatur beschrieben, wobei biologische Faktoren die Natur dieser Tendenzen maskieren können.

Für den Sauerstofftransport von FCs *in vivo* müssen die Gaslöslichkeit und die vorliegenden Partialdrücke berücksichtigt werden, in Übereinstimmung mit dem Gesetz von Henry^[134], wie bereits zuvor erwähnt (s. Abschnitt 2.2.3.1)^[40]. Bei der Mikrozirkulation des Blutes durch die Lunge löst sich daher molekularer Sauerstoff von den FC-Tröpfchen (oder wird chemisch an Hämoglobin gebunden) entgegen dem vorherrschenden Konzentrationsgradienten^[40,145,146]. Dieser Konzentrationsgradient trägt wiederum ein umgekehrtes Vorzeichen in den O₂-konsumierenden Geweben, während hingegen die Konzentration von CO₂ umgekehrte Gradienten in Gewebe und Lunge aufweist und folglich mit dem individuellen Löslichkeitskoeffizienten ausgetauscht und schließlich exhaliert wird. Da die FCs im Gegensatz zum zentralen Eisen(II)-Ion des Hämoglobins keine äquivalente Möglichkeit für eine chemische O₂-Bindung bieten, verläuft die Sauerstoffentladung der FCs etwa doppelt so schnell wie vom Hb^[37,40,147,148]. Aufgrund der bereitgestellten kleinen Emulsionströpfchen, wird die Sauerstofffreisetzung auch durch die damit einhergehende vergrößerte Oberfläche begünstigt^[40]. Die Sauerstofflieferung anhand eines einfachen „Bulk“-Transportes scheint vergleichsweise zu emulgierten FCs simpler und weniger komplex zu sein^[40]. Es wurde daher von *Faithfull*^[145] kommuniziert, dass FCs durch ihr Wirken als „Sprungbretter“ zwischen Erythrozyten und Blutgefäßwänden eine Erleichterung des Sauerstofftransportes in die Gewebe bewerkstelligen^[40]. Es wird angenommen, dass die FC-Emulsionströpfchen in Gefäßen mit schnellem Durchfluss, wie beispielsweise in Arteriolen, größtenteils in der Plasmaschicht, die sich als ein Ergebnis der Erythrozytenströmung eng an den Gefäßwänden formiert, fließen^[40,146]. Innerhalb der Mikrozirkulation vermögen die FC-Emulsionströpfchen

sogar in die kleinsten Kapillaren zu strömen aufgrund ihrer Befähigung Plasmalücken zwischen den Erythrozyten zu besetzen^[40]. Bei lokaler Vasokonstriktion oder Ischämie, wo Erythrozyten praktisch ausgeschlossen werden, werden voraussichtlich Durchströmungen in den betroffenen Gefäßen anhand kleiner FC-Emulsionströpfchen vollführt werden^[40]. Eine solche Emulsion würde unter diesen Bedingungen zur gesamten Gewebeoxygenierung einen signifikanten Beitrag leisten^[40].

Um einen Vergleich hinsichtlich der Sauerstoffaufnahme von FC-Emulsionen mit Blut aufzustellen wurden Massentransfergesetze herangezogen^[40,149]. Mit experimentellen Beobachtungen wurden die theoretischen Ergebnisse dieser Studien verglichen^[40,150,151]. Resultat war, dass es zu einer Erhöhung der Gewebeoxygenierung kommt, vorausgesetzt dass ein bedeutsamer Anstieg des Sauerstoffgehalts an der Gefäßwand aufgrund erhöhter Sauerstoffpartialdrücke der FC-Emulsion zu verzeichnen ist^[40]. Voraussichtlich wandern die Erythrozyten zu den zentralen und weniger scherbeanspruchten Gefäßregionen, wobei eine derartig erhöhte Sauerstoffströmung für inhomogene Dispersionen größer ist^[40,152,153]. Die gesamte erreichte Plasmasauerstoffkonzentration war bei einem Überschuss an FC-Tröpfchen sogar größer, dabei war ein nahegelegener Überschuss an der Gefäßwand nicht notwendig um diesen Anstieg zu verursachen^[40]. Den FC-verstärkten Sauerstofftransport von den Erythrozyten zu den Geweben wurde ebenso von *Perevedentseva et al.*^[154] anhand in Beziehung stehender Simulationsstudien aufgezeigt^[40].

Ein zentraler Punkt, der sich durch die Leberperfusionen herausgezeichnet hat, ist nicht alleinig die Sauerstoffversorgung, sondern ebenso relevant ist der Kohlendioxidabtransport, der durch künstliche Sauerstoffträger auf Perfluorcarbonbasis vollzogen werden kann^[155]. Im Blut ist für diesen Abtransport das Hydrogencarbonat verantwortlich, der das Beisein des Erythrozytenenzym Carboanhydrase erfordert^[155]. Bei Kontrollversuchen mit Salzlösungen oder bei auf Hämoglobin-basierenden künstlichen Sauerstoffträgern stellt dies ein wesentliches Problem dar, aufgrund des raschen Anstiegs des Kohlendioxidpartialdrucks auf ein toxisches Niveau^[155]. Da die Kohlendioxidlöslichkeit in PFCs größer ist als die von Sauerstoff und eine Umbildung zu Hydrogencarbonat nicht erforderlich ist, können beide transpiratorischen Gase in (überwiegend) solvatisierter Form transportiert werden^[155].

2.3 Mechanismen der Nanokapselbildung

2.3.1 Der Ouzo-Effekt

Die Titulierung „Ouzo-Effekt“^[156-158] oder auch „Pastis-Effekt“^[159,160] rührt von den geläufigen, gut bekannten Aperitifs^[157,159] her, wie Ouzo in Griechenland^[156,157,159,160], Pastis^[157,159,160], Pernod^[160], Ricard^[160] und Absinth in Frankreich^[159], Sambuca in Italien^[159,160], Mastika in Südosteuropa, Raki in der Türkei^[159,160] und Arak, der im südöstlichen mediterranen Raum und im Nahen Osten seinen Ursprung hat.

In guter Näherung bestehen diese alkoholischen Getränke aus einem homogenen Dreikomponentengemisch aus Wasser, Ethanol und (*E*)-Anethol des Anisöls^[160]. Diese an sich transparenten und etwa 40 %-igen ethanolischen Extrakte aus Anissamen^[157] bilden bei etwa der fünffachen Verdünnung mit Wasser^[160] des ternären Systems, *via* diffusionskontrollierter Nukleationsprozesse in der nun übersättigten Phase, eine Dispersion mit feinverteilten kleinen Tröpfchen ($\leq 1 \mu\text{m}$ Durchmesser)^[156,160]. Deren Habitus erscheint aufgrund von diffuser Lichtstreuung leicht opaleszierend, opak und milchig-weiß^[156,160] und kann in diesem Zustand relativ lange metastabil existieren^[157]. Für den Ouzo-Effekt ist Wasser als dritter Bestandteil *per se* nicht notwendig; jedoch sollte das zweite Solvens mit dem Hauptsolvens am besten unbegrenzt mischbar sein, das das Solut zu lösen vermag^[156]. Da im Falle von Ouzo das Solut Anethol in Ethanol gut löslich ist, aber sehr schlecht in Wasser, entsteht daher eine Zwei-Phasen-Dispersion^[156,160].

Der Ouzo-Effekt ermöglicht die Herstellung von Dispersionen mit kleinen, feinverteilten Tröpfchen im Größenbereich von 100 nm bis zu etwa $4 \mu\text{m}$ ^[157] in einer umgebenden Flüssigphase ohne den Einsatz von Tensiden^[160], Dispergatoren oder jedwede Form von mechanischem Mischen^[156], bei dem der beträchtliche Anstieg der Oberflächenenergie kompensiert werden muss^[160]. Daher kam der Ouzo-Effekt auch in dieser Arbeit zur Anwendung, denn er könnte eine Alternative zu den nur beschränkt auf industrielle Maßstäbe anwendbaren Abscherungsmethoden oder zur Ultraschallbehandlung darstellen^[157]. Die Ouzo-Emulgierung ist spontan und erstreckt sich über das Gesamtvolumen; ferner findet keine Regulierung über die Wahl eines Tensids statt^[157]. Vorteile sind insbesondere die sehr kleinen, oft nanoskalig erhaltenen Partikelgrößen, die einfache Beschaffenheit der Ausrüstung und geringe Energiekosten gegenüber anderen Prozessen, wie die der Hochdruckhomogenisierung^[161]. Durch diesen Prozess werden kleinere Partikel gebildet als solche, die mit konventionellen Methoden, wie z.B. mit Lösungsmittel-

verdampfungsverfahren, hergestellt werden^[160]. Darüber hinaus ist die einfache Durchführung als Online-Prozess^[161] möglich. Der Hauptnachteil von den so präparierten Dispersionen oder Emulsionen ist die große Verdünnung^[161], den man aber durch eine nachträgliche Aufkonzentrierung umgehen könnte.

Der recht vielfältige Ouzo-Effekt kann außerdem zur Herstellung von wirkstoffbeladenen Nanopartikeln^[157,160,162] mit kommerziell erhältlichen Polymeren^[157] eingesetzt und im halbtechnischen Maßstab für die Hochskalierung von Nanokapseldispersionen^[123] angewandt werden. Kleine Nanosphären, Liposomen und Vesikel können ebenfalls mittels selbiger Methode hergestellt werden^[157,160].

Abb. 5 dokumentiert nun die Charakteristika einer ternären Lösung (ein mit Wasser vollständig mischbares Solvens + darin gelöstes hydrophobes Solut + Wasser) in einem Phasendiagramm, die zur Entstehung des Ouzo-Effektes erforderlich sind:

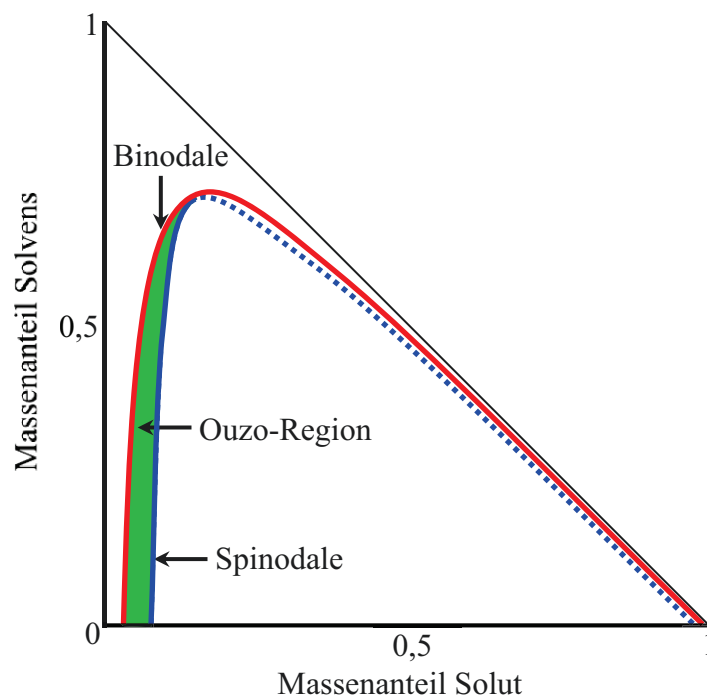


Abb. 5: Dreikomponenten-Phasendiagramm bei konstanter Temperatur und Druck, modifiziert nach *Vitale und Katz*^[156]. Die Binodale kennzeichnet die Grenze der Mischbarkeit und repräsentiert die thermodynamischen Minima der freien Enthalpie ΔG (const. p , T) (oberhalb befindet sich das Ein-Phasengebiet). Die Spinodale entspricht der thermodynamischen Stabilitätsgrenze (unterhalb befindet sich das Zwei-Phasengebiet). Der Anteil des Wassers entspricht der Differenz aus den Massenanteil-Wertepaaren.

Demnach bildet der Ouzo-Bereich in diesem Phasendiagramm eine Enklave zwischen der binodalen und der spinodalen Kurve. Es ist Systemen innerhalb dieses recht schmalen und

metastabilen Ouzo-Bereiches möglich für längere Zeit zu existieren, vorausgesetzt es liegen kinetische Hindernisse vor, die eine weitere Minimierung der freien Enthalpie behindern^[156].

Die deskriptive Abhandlung des Ouzo-Effektes zur Synthese nanoskaliger Systeme lässt nun die Frage des zugrunde liegenden Mechanismus, insbesondere im Hinblick auf die vorteilhafte Durchführung, aufkommen. Obwohl der Ouzo-Effekt auf den ersten Blick sehr einfach erscheint gibt es bisher keine allgemeine Theorie, die ihn umfassend und mit allen mechanistischen Details erklärt. Es gibt daher mehrere Theorien, die alle prinzipiell nicht ohne Nukleationsprozesse auskommen können. Daher sei zunächst die allgemein anerkannte klassische Theorie der Nukleation^[163,164] erklärt:

Ein Multikomponentensystem besteht anfangs zunächst als einzelne Phase, dessen freie Enthalpie sich nach Perturbation physikalischer Bedingungen, wie Temperatur, Druck oder homogenem Mischen mit einer weiteren Komponente anpasst, so dass eine Phasenseparation energetisch begünstigt wird^[163,164]. In Abb. 6 ist ΔG als eine Funktion vom sphärischen Nukleations-Keimradius r dargestellt:

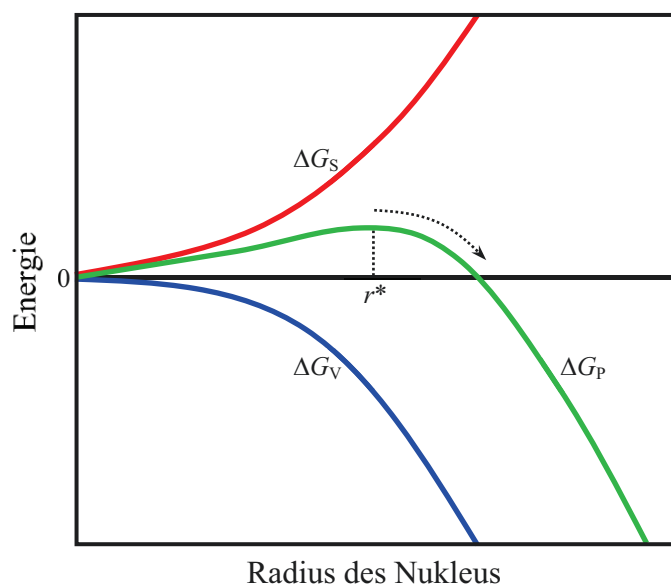


Abb. 6: Energieschema der homogenen Nukleation^[164], modifiziert nach *Rieger und Horn*^[163], ΔG_P ist die freie Energie eines Partikels mit dem Radius r (grün), ΔG_S stellt die Oberflächenenergie dar (rot), ΔG_V kennzeichnet den Verlauf der „Bulk“-Energie (blau) und r^* markiert den Radius des kritischen Nukleations-Keims.

Das Maximum der freien Energie wird beim kritischen Radius des Nukleationskeims r^* durchlaufen^[163,164]. Das Modell beschreibt die anfängliche reversible Bildung von kleinen Clustern, die wegen der Entropieabnahme zunächst thermodynamisch instabil sind^[164]. Wegen der statistischen Natur der Prozesse fluktuieren die Partikelgrößen, wodurch die

Wahrscheinlichkeit der Formierung von Clustern kritischer Größe gegeben ist^[163]. Eben diese Cluster kritischer Größe (Embryos)^[164] sind befähigt weiter zu wachsen ($r > r^*$), während sich hingegen kleinere Cluster ($r < r^*$) wieder auflösen^[163]. Auch wenn ΔG_P beim kritischen Radius immer noch positiv ist, das größere Energiegefälle in Richtung größerer Radien ist ausschlaggebend dafür, dass größere Partikel gebildet werden, da in dieser Richtung differenziell mehr Energie freigesetzt wird als auf dem Rückweg. D.h., die Geometrie der Potentialhyperfläche zwischen diesen beiden Potentialtöpfen ist entscheidend für die Richtung der Zustandsänderung. Naturgemäß ist diese Krümmung in Richtung des tiefer liegenden Potentialtopfes bei gleicher Symmetrie größer und daher „fällt“ das System nach Aufbringung einer minimalen Arbeit $\Delta G^* (= \Delta G_P(r^*))$ spontan und irreversibel in diese Richtung ab.

Um insbesondere Monodispersität in bestimmten Systemen zu erklären, wird häufig in der klassischen Kolloidchemie ein darauf basierendes Modell verwendet (Abb. 7)^[163]. Solange bis die kritische Nukleations-Konzentration (c_{\min}) erreicht wird^[163,165] (Phase I), steigt die Konzentration einer gelösten Substanz weiter an, z.B. durch Freisetzung in einer Reaktion^[163]. Ab diesem Punkt bilden sich metastabile Nukleations-Keime (kritischer Größe) aus, die wie oben beschrieben anfangen zu wachsen^[163] (Phase II). Erst nach dieser Wachstumsphase werden die Cluster thermodynamisch stabil und es kann sich ein heterogenes Keimwachstum anschließen (Phase III).

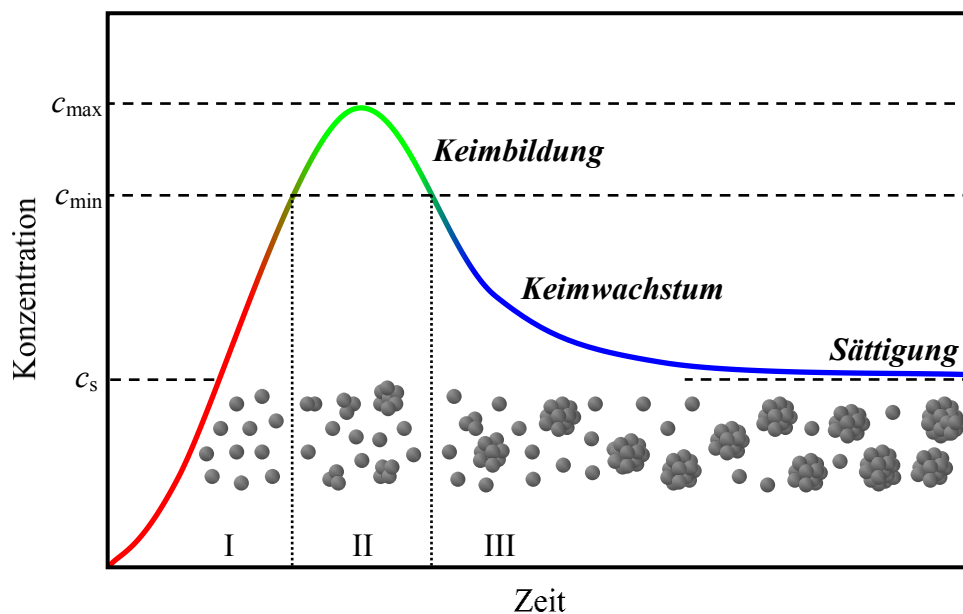


Abb. 7: Modell von LaMer und Dinegar^[165] zur Beschreibung von Keimbildung und Keimwachstum in der kontrollierten Partikelbildung, modifiziert nach Rieger und Horn^[163].

Wie bereits eingehend erwähnt gibt es mehrere Modelle, die sich mit dem gesamten Mechanismus des Ouzo-Effektes auseinandersetzen. Nun beschreiben ältere Modelle die spontane Emulgierung, z.B. als ein Ergebnis einer oder mehrerer Bedingungen aus Grenzflächenturbulenz, Diffusion und „Strandung“ oder als aus einer negativen Grenzflächenspannung resultierend^[166,167]. Neuere Literaturquellen beschreiben die Ouzo-Emulgierung etwas allgemeiner als „Solvent shifting“^[161,163,167-169], da sich das Verfahren nicht ausschließlich auf Ouzo bzw. anisöhlhaltige Systeme beschränkt. Demnach resultiert die Nanopartikelbildung aus einer Verdünnung der Solut-Moleküle in einem schlechten Lösungsmittel, wie Wasser^[161], wobei das Solut-lösende Solvens (z.B. EtOH) vollständig mit dem anderen Lösungsmittel (z.B. H₂O) mischbar ist. Als Folge der Verdünnung beginnt die Nukleation von Solut-Molekülen^[161]. Der damit ebenfalls aufkommende Aggregationsprozess (Nukleations-Aggregations-Mechanismus) führt zur Etablierung der kolloidalen Stabilität nach Adsorption von Ionen oder Tensid-Molekülen und Ablauf einer Start-, Verdünnungs- und Stoppzeit^[161]. Ebenfalls wird durch das kinetische Modell von Smoluchowski die finale Größe der Nanopartikel prognostiziert, die am Ende der Aggregation erreicht wird und die sich nach dem Potenzgesetz der Solut-Konzentration ändert^[161]. Wie bei allen Aggregationsprozessen, die dem DLCA (Diffusion-Limited Cluster Aggregation)-Mechanismus^[170,171] folgen, hat die Grundgesamtheit der Nanopartikel eine schmale Größenverteilung und erfordert große Zugabemengen an Wasser^[161]. Bei kleineren Zugaben an Wasser ist die Nukleations-Grenze hoch, so dass die Nukleations-Keime durch das Inkorporieren von nicht aggregierten Solut-Molekülen wachsen (Nukleations- und Wachstums-Mechanismus) und somit größer und weniger zahlreich sind^[161]. Beide Mechanismen bringen relativ stabile Partikeldispersionen hervor; sie sind aber begrenzt durch sehr geringe Solut-Konzentrationen^[161]. Anderenfalls führt die Koaleszenz von Partikeln zur Formierung von viel größeren Mikropartikeln^[161].

Die spezielle Synthese der PnBCA-PFD-Nanokapseln basiert sowohl auf dem „Solvent-shifting“-Modell^[161,163,167-169] als auch auf der homogenen Flüssig-Flüssig-Nukleation^[156,157], die auch als Ouzo-Effekt^[156,157] bezeichnet wird. Diese spontane Emulgierung bzw. Tröpfchen-Bildung^[156,157] wird durch vier Schritte beschrieben und ist schematisch in Abb. 8 dargestellt:

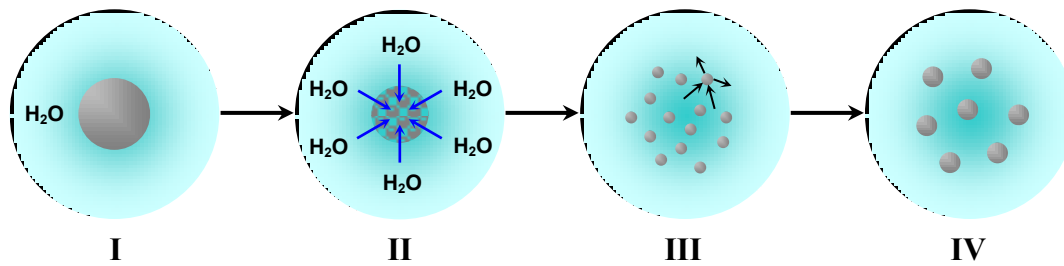


Abb. 8: Schema des Flüssig-Flüssig-Nukleations-Prozesses, modifizierte Wiedergabe nach *Ganachaud und Katz*^[157].

Im ersten von vier Schritten wird die organische Phase mit dem wasserunlöslichen Fluid in die wässrige Phase transferiert (I)^[157]. Die Konsequenz der so resultierenden Konzentrationsgradienten ist die Triebkraft des spontan einsetzenden Diffusionsprozesses in Übereinstimmung mit den Fick'schen Gesetzen^[172-174]. Es erfolgt also eine Diffusion von Wasser in die Fluid-enthaltende organische Phase und eine Diffusion von organischem Lösungsmittel (z.B. EtOH) in das umgebende Wasser (II)^[157]. Da die Diffusionsgeschwindigkeit der verschiedenen Verbindungen mit ihren individuellen vom Molekulargewicht bzw. hydrodynamischen Radius abhängigen Diffusionskoeffizienten skaliert werden müssen, kann die Diffusion des schlecht wasserlöslichen Fluids (z.B. PFD) entgegen seinem Konzentrationsgradienten als vernachlässigbar klein angesehen werden ($H_2O > EtOH \gg PFD$). Die Folge der Diffusionsprozesse ist eine Übersättigung des Fluids, die ursächlich für die homogene Nukleation (vgl. S. 33) ist^[157]. In umliegende Tröpfchen diffundiert das Fluid^[157]. Wenn die wässrige Phase nicht länger mit dem Fluid übersättigt ist, wird nachfolgend das Wachstum der Fluid-Tröpfchen beendet (III)^[157]. Aufgrund von Flüssig-Flüssig-Nukleation entsteht final eine metastabile Emulsion (IV)^[157]. Diese resultierenden Tröpfchen fungieren als Matrices oder Template für die Kapselwandbildung, bei der die anionische Grenzflächenpolymerisation des Monomers *n*-Butylcyanoacrylat an den Grenzflächen mit der wässrigen Lösung stattfindet. *Chouinard et al.*^[175] eruierten, dass die Größe der Emulsions-Tröpfchen, bei denen kein Polymer eingesetzt worden ist, annähernd der finalen Nanokapselgröße entspricht. Ergo zeigt diese Untersuchung auf, dass die Nanokapselgröße hauptsächlich durch die Größe der anfangs gebildeten Emulsions-Tröpfchen bestimmt wird, also vor Bildung einer gleichmäßigen polymeren Umhüllung^[175].

Der Ouzo-Effekt findet also nur statt, wenn derartige Lösungen durch eine schnell zugeführte und ausreichende Menge Wasser in die metastabile Region versetzt werden^[156]. Dazu muss sich die Löslichkeit des Solut (z.B. PFD) schneller als in einem linearen Zusammenhang mit

der Wasserzugabe erniedrigen, damit eine möglichst hohe zur Übersättigung exponentiell ansteigende Nukleationsrate erzielt wird^[156], denn nur in großer Übersättigung besteht eine entsprechend große statistische Wahrscheinlichkeit Nukleationskeime kritischer Größe vorzufinden, die den homogenen Nukleationsprozess initiieren (vgl. S. 35).

Nach Abschluss dieses diffusionsgetriebenen Prozesses, der vermutlich auf der Millisekunden-Skala oder schneller stattfindet, resultiert eine relativ homogene Dispersion^[156]. Fast vollständig auf der Ostwald-Reifung begründet sich ein mögliches Fortschreiten des Tröpfchen-Wachstums^[156]. Dabei wachsen die größeren Tröpfchen auf Kosten der kleineren, da die Löslichkeit der Komponenten in kleineren Tropfen größer ist als in großen Tropfen^[156]. Die Kinetik der Ostwald-Reifung verläuft jedoch mit deutlich größeren Zeitkonstanten (> 1 s) als die der homogenen Nukleation, da einerseits die Auflösungsraten sehr klein sind, sich die „scheinbaren Gleichgewichte“ also nur sehr langsam einstellen^[156]. Andererseits werden die Diffusionsgeschwindigkeiten im Zuge des Prozesses bei sich vermindernder Tröpfchen-Anzahl kleiner, wodurch im Mittel eine größere Distanz in der Diffusion von Molekülen zwischen den Tropfen überwunden werden muss^[156].

Feynman^[176] definierte den Gleichgewichtszustand als: „*when all the fast things have happened but the slow things have not*“.

Da die statistisch getriebene homogene Nukleation und die Ostwald-Reifung auf verschiedenen Zeitskalen ablaufen, sollte das Ergebnis direkt nach einer Synthese nach dem Ouzo-Effekt hauptsächlich von der Nukleation abhängen. Die Polymerhülle der in dieser Arbeit synthetisierten Nanokapseln verhindert allerdings weitestgehend die Ostwald-Reifung; Änderungen in ihren Größenverteilungen sind eher auf andere Prozesse, wie Agglomeration und untergeordnet Quellung, zurückzuführen und werden im späteren Verlauf eingehender diskutiert.

2.3.2 Die anionische Grenzflächenpolymerisation

Nanokapseln können prinzipiell mittels vier unterschiedlichen Herstellungsmethoden generiert werden, dies sind die Grenzflächenfällung, die Grenzflächenanlagerung, das Self-Assembly-Verfahren oder, wie im Fall der PnBCA-PFD-Nanokapseln, die Grenzflächenpolymerisation^[18].

Bei der Herstellung von Polyalkylcyanoacrylat-Nanokapseln wird durch Polymerisation an den Grenzflächen zwischen den zwei flüssigen Phasen einer Emulsion oder der festen und der flüssigen Phase einer Suspension die Kapselwand gebildet^[18]. Bei Einsatz von O/W- oder W/O-Emulsionen ist das Monomer meist in der organischen Phase gelöst und seine Polymerisation wird gezielt durch Addition geeigneter Inhibitoren oder indirekt durch Vorgabe bestimmter physikalischer Parameter, wie beispielsweise durch pH-Wert- und/oder Temperaturänderung^[177-179] der wässrigen Phase, aber auch durch Faktoren wie Diffusionsraten und Oligomer- und Polymerbeweglichkeit^[177], beeinflusst^[18]. Durch die amphiphilen Eigenschaften des Monomers wird dabei eine akkumulative Anordnung der Monomere an den Grenzflächen forciert^[18]. Nach dem unmittelbaren Kettenstart der Polymerisation entsteht an den Grenzflächen eine dünne Polymerwand, die die gewünschten Kapselstrukturen ausbildet^[18]. Das resultierende Polymernetzwerk ist entweder durch chemische oder physikalische Vernetzung stabilisiert und besteht aus einigen molekularen Schichten^[18]. Der Wirkstoff, der abhängig von der Beschaffenheit der Originalemulsion entweder zur organischen oder zur wässrigen Phase gegeben wird, ist im flüssigen inneren Kern immanent^[18].

Wie bereits erwähnt, wird die Grenzfläche (s. Abschnitt 2.3.1) unter Ausnutzung des Ouzo-Effektes bereitgestellt. Nun ist der Reaktionsmechanismus der anionischen Polymerisation^[180] hinreichend gut untersucht und geklärt, wobei allerdings das intermediäre Auftreten während der Ouzo-Emulgierung weitere Unklarheiten aufwerfen kann. Wenngleich die Bildung der Matrices nach dem Ouzo-Effekt noch Fragen aufwirft, so könnte der Mechanismus der anionischen Grenzflächenpolymerisation einerseits als „einfache“ Kombination verstanden werden oder andererseits als ein „komplexeres“ Phänomen aus Grenzflächendynamik mit überlagernden Polymerisationsbeiträgen ansehen werden. Eben diese beiden Gedankengänge werden in den Theorien von *Al Khouri Fallouh et al.*^[30,181,182] und *Gallardo et al.*^[183] aufgegriffen, wobei erstere zunächst thematisiert wird.

Die Theorie nach *Al Khouri Fallouh et al.*^[30,181,182] beschreibt, wie Kapseln durch Polymerumhüllung der Wirkstoff-Matrices, die den Kapselkern bilden, entstehen. Dieser Zusammenhang ist in Abb. 9 anhand von *n*-Butylcyanoacrylat gezeigt, wobei diese auch den Reaktionsmechanismus integriert:

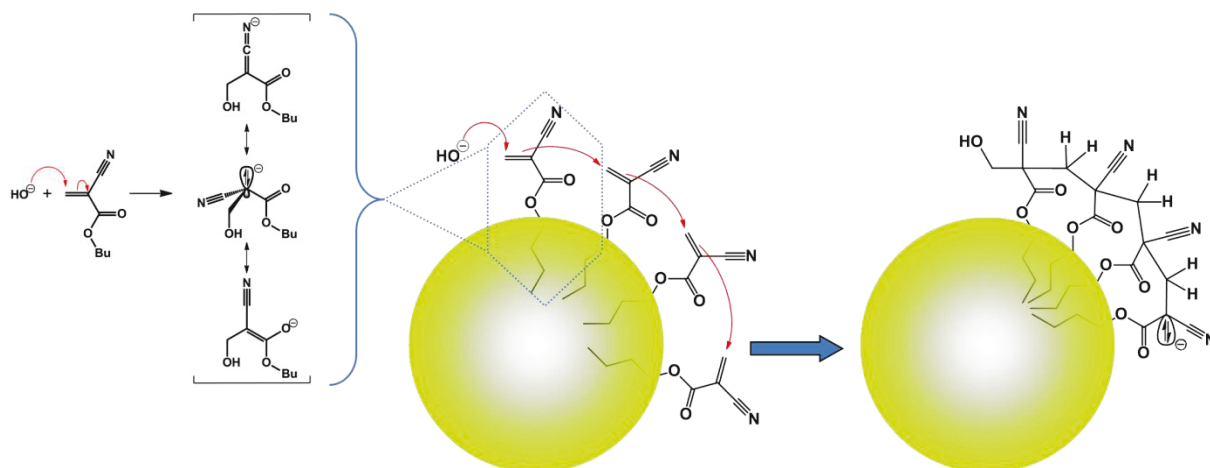


Abb. 9: Resonanzstrukturen des *n*-Butylcyanoacrylats (links) und die Bildung der festen Kapselschalen durch anionische Grenzflächenpolymerisation nach *Al Khouri Fallouh et al.*^[30,181,182] (Mitte und rechts).

Die nach dem Ouzo-Effekt hergestellte homogene Mischung, in der das Agens *cis*-, *trans*-Perfluordecalin gelöst ist, stellt den Ausgangspunkt für den sogenannten „Dispersions-Polymerisations-Prozess“^[23,157] dar. Die Matrices aus Perfluordecalin, die die künftigen Kapselkerne repräsentieren, werden nach Ablauf der anionischen Grenzflächenpolymerisation von den gebildeten polymeren Kapselschalen umschlossen.

Die anionische Grenzflächenpolymerisation des *n*-Butylcyanoacrylats (*n*BCA) wird an den PFD-Grenzflächen durch Hydroxidionen, die aus der Autoprotolyse der umgebenden Wassermoleküle stammen, initiiert. Im zweiten Schritt fungiert das resonanzstabilisierte Carbanion als Nukeophil für den Angriff an das benachbarte olefinische Kohlenstoffatom. Eine Kaskade dieser Reaktion folgt und wird durch Hydroniumionen gequencht bzw. beendet. Final ergeben sich polymere Kapselschalen (siehe Abb. 9) um die Perfluordecalin-Matrices.

Anzumerken ist, dass eine bevorzugte Orientierung der *n*BCA-Monomere zwischen der PFD/Wasser-Grenzfläche durch hydrophobe bzw. dipolare Kräfte resultieren sollte, die die Kapselbildung steuert.

Einen Bildungsmechanismus von Nanokapseln und Nanosphären aus PiBCA (Poly-*iso*-butylcyanoacrylat) zeigt das Modell nach *Gallardo et al.*^[183] anhand von vermuteten Fragmentierungen im Polymerfilm auf (siehe Abb. 10):

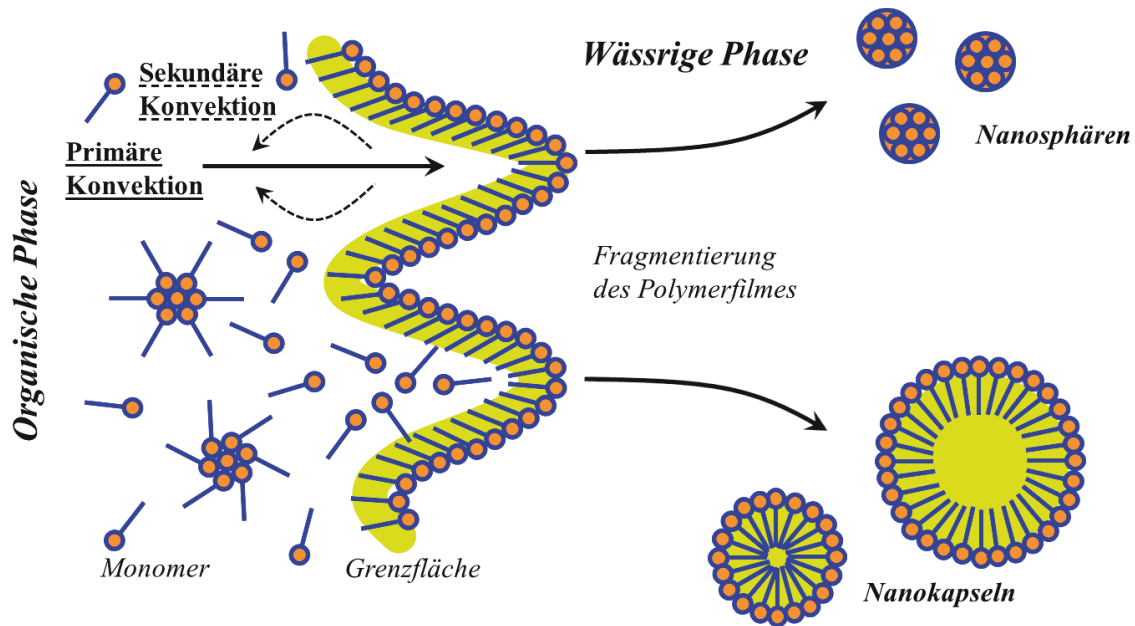


Abb. 10: Schema des Bildungsmechanismus von Nanokapseln und Nanosphären, modifizierte Wiedergabe nach Gallardo *et al.*^[183].

Kennzeichnend für die dabei eingesetzten Monomere und Oligomere aus *i*BCA sind ihre sehr gute Ethanollöslichkeit und ihre hingegen sehr schlechte Wasserlöslichkeit^[183]. Ein Anstieg der primären Konvektionsströme^[166,183-185] resultiert, sobald das in Ethanol gelöste Monomer und Oligomer aus der organischen in die wässrige Phase diffundiert; folglich wird eine hohe Konzentration an *i*BCA an der Grenzfläche erzielt^[183]. Die ersten kettenwachstumsfähigen und grenzflächenaktiven Oligomere, die schlecht wasserlöslich sind, verursachen beim Kontakt mit der wässrigen Phase einen beginnenden Polymerfilm durch Anlagerung an der Phasengrenzfläche^[183,186-190]. Dieser Polymerfilm fungiert als Monomer-Diffusionsbarriere^[183]. Geschützt von vorwiegend in der wässrigen Phase vorkommenden Polymerisationsinhibitoren, kann ein Wachstum der Polymerketten an der Grenzfläche auf der organischen Seite entstehen^[183]. Ein Grenzflächenspannungsgradient, der ansteigende Grenzflächenturbulenzen initiiert, resultiert aus der hohen Konzentration des *i*BCA an der Grenzfläche^[183,191]. Die Fragmentierung des Polymerfilms und die Bildung der Polymerspezies werden durch den Marangoni-Effekt^[166,169,183-185] verursacht, der durch die an der Grenzfläche entwickelten Turbulenzen und sekundären Konvektionsströmungen resultiert^[183]. Häufig entsteht bei Diffusion nahe einer Grenzfläche Instabilität, die diese Strömungen durch Grenzflächenspannungsgradienten verursacht^[169,184]. Lokale Übersättigung wird durch den Marangoni-Effekt verursacht, so dass die Emulgierungsrate durch wachsende Raten des Massentransports unweit der Grenzfläche sehr stark ansteigt^[169,192]. Sowohl beim Marangoni-Effekt als auch bei lokaler Übersättigung resultiert in tensidhaltigen Systemen ein

Massentransport, der den Transport von Einzelmolekülen, Mizellen, anderen Aggregaten, Flüssigkristallen oder Mikroemulsionsphasen umfassen kann^[169]. Laut *Gallardo et al.*^[183] weisen die bimodalen Größenverteilungen Durchmesser von 230 nm für Nanokapseln und 100 nm für Nanosphären bei ähnlichem Molekulargewicht des Polymers auf. Daraus wird nach *Gallardo et al.*^[183] geschlossen, dass nur ein einziger Polymerisationsmechanismus stattfindet, und zwar der an der Grenzfläche zwischen der organischen und der wässrigen Phase. Bei Abwesenheit von einzukapselndem Öl kommt es zur Bildung polymerer sphärischer Partikel und zum Auftreten von Polymerflocken, deren Entstehung wahrscheinlich auf der Ethanol-Diffusion beruht^[183]. Aufgrund von Ethanol-Diffusion und Marangoni-Effekten können, beim Einsatz von Öl bei ansteigender spontaner Emulgierung in der organischen Phase, Konvektionsströme und Grenzflächenturbulenzen ausgelöst werden^[183]. Der Polymerfilm, der durch Grenzflächenpolymerisation zwischen der organischen und wässrigen Phase generiert wurde, bricht und kann die Öl-Tröpfchen umschließen^[183,193]. Eine Affirmation fand dieses Phänomen anhand der Bildung von Polymerfilmen an der O/W-Grenzfläche mit einem gleichmäßig verteilten Ölfilm und einer undulierenden Wasserseite, in der die Polymerkolloide auf der Wasseroberfläche einen gleichen Polymerisationsgrad besitzen und die schließlich zur Nanokapselbildung führen^[183]. Übereinstimmend mit diesem Entwurf ist es möglich, dass anhand von Fragmentierungsrückständen des polymeren Grenzflächenfilms Nanosphären, die in diesem System betrachtet wurden und die keine Öl-Tröpfchen enthalten, gebildet werden^[183]. Daher besitzen die kleineren Nanopartikel eine Matrixstruktur (Nanosphären), wohingegen die größeren eine Hohlkörperstruktur (Nanokapseln) aufweisen^[183].

Der Mechanismus nach *Al Khouri Fallouh et al.*^[30,181,182] besticht auf den ersten Blick durch seine Einfachheit, jedoch wird die Bildung von Nanosphären nicht erklärt. Das Modell nach *Gallardo et al.*^[183] kann jedoch die Bildung beider Nanopartikelspezies beschreiben. Das Schwierige hierbei ist jedoch zu verstehen, wie sich genau die polymerisierenden oder bereits polymerisierten Monomere an der Grenzfläche nach der Abspaltung über die Grenzflächenturbulenzen dabei so arrangieren, dass eben auch Kapseln und nicht nur Polymerflocken oder Nanosphären entstehen. Dieses Modell erklärt jedoch gut, wie es zu der Bildung von Kapsel-Matrices kommt, was in der Vorstellung von *Al Khouri Fallouh et al.*^[30,181,182] fehlt. Insofern könnte man beide Modelle als synergistisch ansehen.

2.4 Stabilität von Nanokapseln

2.4.1 Agglomerationskinetik und sterische Interaktionen der PnBCA-PFD-Nanokapseln

Die dispergierten PnBCA-PFD-Nanokapseln altern aufgrund von Agglomeration irreversibel^[194], da diese Dispersionskolloide thermodynamisch instabil sind. Allerdings besitzen Dispersionskolloide eine kinetische Stabilisierung, die den Zerfall in Richtung ihres thermodynamischen Minimums inhibiert. Daher ist der Alterungsprozess ein spontaner und relativ langsam ablaufender Agglomerationsprozess^[194].

Zur langsamen perikinetischen Agglomeration führt auch die Brownsche Molekularbewegung^[195-199], die zur diffusionskontrollierten richtungsunabhängigen Agglomeration führt^[194,200]. Während der Kinetik der langsamen Brownschen Agglomeration^[201] lagern sich die kolloidalen Nanopartikel zu größeren Aggregaten bzw. Agglomeraten durch interpartikuläre Interaktion zusammen, aufgrund von unzureichender sterischer oder elektrostatischer Stabilisierung^[194].

Die agglomerierten Nanopartikel besitzen im Verbund zunächst noch ihre anfängliche Gestalt; vermutlich altern diese aber mit zunehmender Zeit irreversibel zu „gesinterten“ Nanopartikeln^[194]. Die zeitabhängige Agglomeration geht quantitativ mit einer immanenten Abnahme der Partikelkonzentration und einer Verbreiterung der Partikelgrößenverteilung unter Erhöhung der durchschnittlichen Größe vergleichsweise zum initialen Zustand einher^[194].

Um näher zu beleuchten, wie und warum Agglomeration stattfindet, wird folgend die DLVO-Theorie^[194] (Derjaguin, Landau^[202], Verwey und Overbeek^[203]) herangezogen, die die elektrostatischen und attraktiven Kräfte dispergierter Partikel umfassend erklärt. Die Theorie geht dabei von einer elektrochemischen Doppelschicht^[194] aus, deren Vorhandensein auf den Partikeln zu einer elektrostatischen Abstoßung führt. Diese Abstoßung sollte im Falle einer metastabilen Dispersion die van der Waals-Anziehung^[194] mindestens kompensieren. Diese Zusammenhänge sind in nachstehender Abbildung (Abb. 11) zusammengefasst:

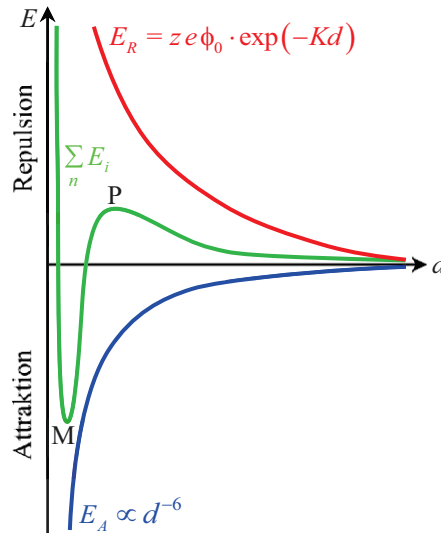


Abb. 11: Eine der möglichen Energie-Abstandsfunctionen zwischen elektrostatisch-stabilisierten Partikeln (modifiziert nach Lit.^[194,204]).

Die Lage der Energie der elektrostatischen Abstoßung (E_R) im Diagramm in Abb. 11 wird maßgeblich durch die Ladung der Oberfläche ($q = ze$) und dem Potential der Doppelschicht ϕ_0 bestimmt. Der exponentielle Abfall von E_R mit dem Partikelabstand d wird außerdem vom Faktor K beeinflusst, der von der Elektrolytkonzentration abhängt^[194]. Da die anziehende Wechselwirkungsenergie (E_A) mit der sechsten Potenz des Abstandes abfällt, resultiert ein Verlauf aus beiden Beiträgen, der verschiedene Extremstellen als Charakteristika aufweist. Angefangen bei hohen Abständen liegen zunächst keine oder nur infinitesimale Wechselwirkungen vor. Bei weiterer Annäherung zweier Partikel überwiegt die abstoßende Wirkung bis ein primäres Maximum (P) erreicht wird, das nur erreicht werden kann, wenn die Partikel diese Barriereenergie in Form von kinetischer Energie ($1,5 kT$)^[204] mindestens bei geeigneter Trajektorie aufbringen. Es kommt dann zur Kollision bzw. zu einer Koagulation^[194] der Partikel, sobald diese eben genug Translationsenergie bereitstellen. Das System treibt diese Partikel dann in das primäre Minimum (M), das genau die Radiensumme beider Partikel darstellt.

Nun sind die in dieser Arbeit eingesetzten nanopartikulären Systeme nicht ausschließlich durch Oberflächenladungen elektrostatisch stabilisiert, sondern vorwiegend durch ihre Funktionalisierung mit großen Tensidmolekülen sterisch stabilisiert. Dabei sind manche Tensidpolymerkompartimente direkt auf der Partikeloberfläche adsorbiert, während hingegen andere Kettenteile in das umgebende Fluid ausgedehnt sind^[171]. Befinden sich nun zwei Partikel auf Kollisionskurs bzw. in gegenseitiger Nähe, so überlappen sich ihre Polymerschichten und es kommt zur Abstoßung^[171]. Dies wird durch eine ansteigende Polymermolekülkonzentration im Raum zwischen den Partikeln erklärt, welche bei Überlappung der beiden Polymerschichten eine Erhöhung des chemischen Potentials und damit auch des osmotischen Drucks zur Folge haben^[171].

Copolymere, wie Block- oder Graft-Copolymere, weisen gute Adsorptionseigenschaften auf^[171], die für eine gute Stabilisierung ebenso von Nöten sind, wie weit in das Medium hineinragende Polymerkettenteile. De Gennes^[205] postulierte, dass bei Überlappung zweier Adsorbatschichten aus Block- oder Graft-Copolymeren, folgende Beziehung für die Bildung der sterischen Wechselwirkung $F(D)$ gültig ist^[171]:

$$F(D) = \frac{\beta \cdot k \cdot T}{s^3} \left[\left(\frac{2\delta}{D} \right)^{\frac{9}{4}} - \left(\frac{D}{2\delta} \right)^{\frac{3}{4}} \right] \quad (\text{Gl. 1})$$

D : Abstand zwischen den Oberflächen

β : Anpassungsparameter

k : Boltzmann-Konstante

T : Temperatur

s : Abstand zwischen den Enden der terminal angehafteten Polymerketten

δ : Dicke der Polymerschicht

Der erste Term in Gl. 1 berücksichtigt den osmotischen Druck des Polymers^[171]. Der zweite Term beschreibt die Streckung des adsorbierten Polymers fernab der favorisierten Zufallsknäuelanordnungen^[171].

2.4.2 Kinetik der Nanopartikel-Selbstaggregation

In der Literatur wird bei der Aggregation gering-konzentrierter Partikel zwischen zwei Hauptmechanismen unterschieden: die diffusionsbegrenzte Clusteraggregation (Diffusion-limited cluster aggregation DLCA) und die reaktionsbegrenzte Clusteraggregation (Reaction-limited cluster aggregation RLCA)^[171,206,207]. Bei der DLCA führt jede Kollision zwischen zwei Clustern, deren Häufigkeit durch die Diffusionszeit determiniert ist, zur Bildung eines neuen kombinierten Cluster-Aggregates^[171]. Dies resultiert in offenen Strukturen, weil die Partikel andere Partikel tangieren bevor sie tiefer die Clusterstruktur eindringen können^[170]. Es ergibt sich außerdem eine eher monodisperse Clustergrößenverteilung, da die kleinsten und damit schnellsten Cluster folglich durch ihre höhere Kollisionsfrequenz schneller konsumiert werden^[170]. Für dieses System gilt die Smoluchowski-Kinetik der schnellen Aggregation^[161,170].

Bei der RLCA ist dahingegen nur ein kleiner Teil aller Partikel- oder Clusterstöße reaktiv für die Bildung neuer Aggregate^[171]. Es liegt dabei keine Energiebarriere, wie bei der elektrostatischen Stabilisierung (vgl. Abb. 11) vor, sondern es wird dabei eine Reversibilität der Kollisionen angenommen^[170]. Dadurch werden kompaktere Clusterstrukturen und polydispersere Größenverteilungen als nach dem DLCA-Mechanismus alternder Kolloide beobachtet^[170].

Für die in dieser Arbeit synthetisierten Systeme wurden ebenfalls kinetische Daten gesammelt, die sich prinzipiell für die Diskriminierung eines einheitlichen Aggregationsmechanismus oder für einen möglichen Wechsel von RLCA nach DLCA nutzen lassen. Dazu könnte man eine Kinetik zweiter Ordnung annehmen, deren Größenanpassung mit Matrizen von Geschwindigkeitskonstanten verschiedenartiger Cluster möglich ist^[206,207]. Jedoch ist dies nur mit sehr gut definierten Systemen valide, die einen kleinen Polydispersitätsindex besitzen. Angesichts der synchronen Genese von Nanosphären bei der Nanokapselsynthese (vgl. Kap. 3.1) ist dieses Kriterium leider nicht erfüllt, sofern man keine aufwendige Größenfraktionierung vornimmt, mit der weitere Unwägbarkeiten aufkommen.

2.4.3 Tenside

2.4.3.1 Polymere Tenside

Polymere Tenside können prinzipiell so konzipiert werden, dass sie über eine starke „Anker“-Kette und eine sich von der Oberfläche ausbreitende „stabilisierende“ Kette verfügen, deren Schichtdicke δ einige Nanometer beträgt^[171]. Bei Annäherung zweier Partikel auf einen Abstand $h < 2\delta$, können die stabilisierenden Ketten eine Überlappung und/oder eine Kompression erfahren^[171]. Dabei tritt ein Verlust von Konfigurationsentropie der Ketten im überschneidenden Bereich auf^[171]. Wenn die Solvation des Polymers sehr ausgeprägt ist, dann wird diese lokale Koexistenz ungünstig, was zu einer starken Abstoßung zwischen den Partikeln führt, die sehr stark mit abnehmendem h für $h < 2\delta$ zunimmt^[171].

Block- und Graft-Copolymere^[208,209] besitzen unterschiedliche Kettenlängen der Blöcke, wie die Polymersegmente PEO-PPO-PEO (Polyethylenoxid-Polypropylenoxid-Polyethylenoxid)^[171]. Die in dieser Arbeit verwendeten amphiphilen Block-Copolymere sind in Tab. 1 aufgelistet:

Tab. 1: Übersicht der eingesetzten Detergentien, wobei a und b für die Blockanzahl des Copolymers stehen^[210-212].

Tensid	Poloxamer	a	b
Synperonic® PE/F68	188	80	27
Lutrol® L44	124	12	20
Lutrol® F68	188	80	27
Lutrol® F87	237	64	37
Lutrol® F108	338	141	44

Die hydrophoben PPO-Ketten sind auf der hydrophoben Oberfläche verankert, wobei die beiden PEO-Ketten auf der Partikeloberfläche in die wässrige Lösung herausstehen und dadurch die sterische Stabilisierung bestimmen^[171].

Diese und andere polymere Tenside erweisen sich als wirksame Stabilisatoren polymerer Emulsionen, die im Falle von Latex-Nanopartikeln sogar eine Kontrolle von Größe und Größenverteilung ermöglichen^[171].

2.4.3.2 Adsorption von polymeren Tensiden an Grenzflächen

Generell müssen bei der Adsorption von polymeren Tensiden zur sterischen Stabilisierung drei Hauptwechselwirkungen betrachtet werden^[171]. Dies sind zum einen die Wechselwirkung der von den adsorbierenden Polymersegmenten verdrängten Lösungsmittelmoleküle mit der Partikeloberfläche. Zum anderen muss auch die Wechselwirkung zwischen den Ketten und den Lösungsmittelmolekülen Berücksichtigung finden; außerdem muss noch die Interaktion zwischen dem Polymer und der Partikeloberfläche berücksichtigt werden^[171]. Weiterhin gilt es, die individuelle Konformationsvielfalt^[171] der ausgedehnten organischen Polymerbestandteile auf den Grenzflächen zu verstehen, denn sie entrichtet einen nicht unbedeuteten Beitrag zur Entropie, da hierdurch die Anzahl der chemisch verschiedenen und Energie-dissipierenden Spezies im System erhöht wird.

Die Entropieabnahme der Polymerkette bei Annäherung an die feste Grenzfläche muss durch die Adsorptionsenergie zwischen den Segmenten und der Oberfläche mindestens kompensiert werden, damit überhaupt eine Adsorption stattfindet^[171]. Jedoch sollte auch hierbei die Erhöhung der Anzahl chemischer Komponenten das Ausmaß des Entropieverlustes etwas schmälern. Optimale Eigenschaften bezüglich dieser thermodynamischen Betrachtungen finden sich eben bei den Block- und Graft-Copolymeren wieder^[171]. Diese bieten ein oder mehrere „Anker“-Ketten, die zudem eine hohe Affinität zur festen Oberfläche aufweisen^[171]. Auf der anderen Seite zeigen die anderen Polymersegmente ein möglichst kleines und damit günstiges Verhältnis von Adsorptions- zu Solvatationsenthalpie^[171].

Außerdem ist zu beachten, dass der von den adsorbierten Polymermolekülen eingenommene Konfigurationsraum auch vom pH-Wert und der Ionenstärke der Lösung abhängt^[171], da dieser Raum maßgeblich für die Stabilisierung verantwortlich ist und lokalen Fluktuationen durch Molekülbewegungen entlang ihrer aktiven Freiheitsgrade nach dem Äquipartitionsprinzip^[213,214] unterworfen ist.

2.5 Nanokapseln in biologischer Umgebung

2.5.1 Physikochemischer und physiologischer Degradationsprozess von PACA-Nanokapseln

PACA-Nanopartikel sind *in vivo* als potentielle *Drug Carrier Systeme* für das *Drug Delivery* und das *Drug Targeting* untersucht worden, wobei ihr Einsatz für medizinische Applikationen ein hohes Maß an Biokompatibilität und -degradierbarkeit erfordert^[215-221]. Außerdem wird die mit dem Abbau korrelierende Wirkstofffreisetzung weitgehend vom Aufbau und der Struktur der Kapselschalen beeinflusst^[18]. Die Abbaurate ist abhängig von der Alkylkettenlänge; die Methyl- und Ethylketten werden beispielsweise schneller abgebaut als die längeren Butylketten^[215,222].

Die Degradationsprozesse von Kapseln oder Partikeln können recht komplex sein. Chemischer Abbau durch hydrolytische Degradation des Polymers^[216,223-227], Oxidation oder enzymatische Reaktion im lebenden Organismus^[228,229], sowie physikalische Zersetzung verursacht durch Scherkräfte, Hitze oder Schall^[230] können die Kapseln zerstören^[18]. Letztendlich führt jede dieser Abbaumöglichkeiten zur gewünschten oder ungewünschten Freisetzung der Kapselinhalte^[18].

PACA-Polymere sind bioerodierbare Polymere, für die bis dato unterschiedliche Abbauewege beschrieben wurden, die von *Nicolas und Couvreur*^[219] und *Vauthier et al.*^[220] zusammenfassend betrachtet worden sind. Der vorherrschende Mechanismus ist die Hydrolyse der Esterbindung an der Alkylseitenkette des Polymers^[223-225], die den korrespondierenden Alkylalkohol und die Poly(cyanoacrylsäure) als Abbauprodukte erzeugt; die Abbauprodukte sind wasserlöslich und *in vivo* leicht über die Nieren auszuscheiden^[219,220]. Die Hydrolyse, die möglicherweise der Hauptabbaumechanismus für PACA-Nanopartikel *in vivo* ist, wird stark von der Länge der Alkylseitenkette des Polymers beeinflusst^[219,220]. Dabei wurde gefunden, dass längere Alkylseitenketten eine niedrigere Toxizität und eine langsamere Hydrolyse aufweisen^[216,219,224,226]. Den größten Einfluss auf die Partikeldegradation hat aber das umgebende Milieu, das die katalytisch-aktiven Esterasen im Serum, in Lysosomen und im Pankreassaft enthält^[219,220,228,229,231]. Eine vollständige Ausscheidung dieser Materialien ist nur für niedermolekulare PACA-Polymere realistisch^[219,220]; typischerweise unter 10.000 g mol⁻¹^[219].

Es wurde ebenfalls postuliert, dass die baseninitiierte segmentablösende Depolymerisationsreaktion einen PACA-Biodegradationsweg darstellen könnte^[232], insbesondere in biologischen Medien, wo sie *in vivo* durch Aminosäuren von Proteinen induziert werden könnte^[219,220].

Allgemein kann die Wirkstofffreisetzung aus Nanokapseln entweder durch Diffusion entlang oder zwischen den Polymersegmenten oder durch Mikrokanäle, sowie durch Poren im Polymernetzwerk erfolgen^[233-235]. Dagegen beruht das *Drug Release* bei Nanosphären auf Erosions- bzw. Degradationsprozessen der Polymermatrix^[223,233,235].

2.5.2 Die *in vivo*-Verteilung von PACA-Nanopartikeln nach intravenöser Verabreichung

PACA-Nanopartikel besitzen als zentrale Faszinosa die Fähigkeit der gezielten Gewebeverabreichung und die Verbesserung der intrazellulären Arzneimittelpenetration^[220]. Nach intravenöser Verabreichung der PACA-Nanopartikel erfolgt deren Aufnahme in Leber, Milz, Lunge und zu einem kleineren Anteil in das Knochenmark^[4,6,220,236,237]. Die Aufnahme der Nanopartikel wird innerhalb der Gewebe hauptsächlich von Makrophagen des mononukleären-phagozytären Systems übernommen^[220,238,239]. Nachdem die Partikel in einem lysosomalen Kompartiment landen^[238], wird die Nanopartikelaufnahme im Verlauf eines endozytären Prozesses vollzogen, wobei deren Abbau stattfindet und währenddessen die löslichen niedermolekularen Bestandteile entstehen, die anschließend renal ausgeschieden werden^[220,223]. Nanopartikel sind aufgrund ihrer starken lysosomalen Lokalisierung ungeeignet für das *Drug Targeting* im Zellzytoplasma^[220]. Dem nanopartikulären System können verschiedene Bestandteile zur Destabilisierung der lysosomalen Membran hinzugefügt werden, um innerhalb des lysosomalen Kompartiments den Einbau zu vermeiden^[220,240]. Somit kann eine Abgabe von einigen Medikamenten in das Zellzytoplasma realisiert werden^[220].

Eine verminderte Nanopartikelaufnahme durch das mononukleäre-phagozytäre System und eine Erhöhung der Zirkulationszeit im Blutkreislauf kann durch Maskierung von PACA-Nanosphären mit Polyethylenglycol erwirkt werden^[220,241-243]. Die sogenannten Stealth[®]-Nanopartikel würden die Befähigung des Extravasierens durch das Endothel, das infolge von Tumorpräsenz permeabel wird, bewirken^[220]. Stealth[®]-Nanopartikel sind einfache und passive Systeme ohne spezifische Zielliganden, bei denen die mikrovaskuläre Permeabilität zwischen

gesunden und veränderten Geweben, sowie ihre langanhaltenden Zirkulationseigenschaften, ausgeschöpft werden^[220].

2.5.3 Partikelgröße und Partikeloberfläche als elementare Kriterien für den medizinischen Einsatz

Aufgrund der Signifikanz und der in dieser Arbeit erhöhten Bedeutsamkeit der partikulären Größen im medizinischen Kontext, wird an dieser Stelle etwas ausführlicher darauf eingegangen.

Um alle Kapillaren passieren zu können, wobei der Durchmesser der kleinsten Blutkapillaren rund 4 µm beträgt, müssen Partikel einen kleineren Durchmesser als der des kleinsten Blutgefäßes haben^[7]. Unmittelbar mit dem Kapillarbett verbunden sind die Blutgefäße, die einen Durchmesser von ≤ 7 µm besitzen, und daher nicht kleine Arterien und Venolen umfassen^[244]. Nach intravenöser Verabreichung werden Partikel mit einer Größe oberhalb von 4-7 µm durch das erste Kapillarbett eingeschlossen, wohingegen eine Befähigung zur Durchwanderung dieser Blutgefäße von kleineren Partikeln, wie Nanopartikeln und anderen kolloidalen Teilchen, besteht^[6,237,245,246]. Eine Filterung findet ebenso durch das erste Kapillarbett bei *Carrier* mit Partikelgrößen oberhalb von 5-15 µm und großen Agglomeraten, bestehend aus kleineren Partikeln, statt^[4].

Durch die Makrophagen des retikuloendothelialen Systems (RES) wird die Gesamtheit der kolloidalen *Drug Carrier*-Systeme, wie auch Nanopartikel, schnell opsonisiert und eingefangen^[247]. Nach intravenöser Injektion werden, wie schon in Kap. 2.5.2 erwähnt, durch das RES, größtenteils durch die Leber und die Milz, aber auch durch die Lunge und das Knochenmark, dispergierte kleine *Carrier*, darunter Nanoemulsionen und Mikroemulsionen, Liposomen, Niosomen und Nanopartikel, entfernt^[4,237]. Nur ein geringer Teil der injizierten Dosis verbleibt im Blutkreislauf aufgrund der schnellen Entfernung durch das RES^[4]. Durch *Coating* mit bestimmten Substanzen, einschließlich Serumbestandteile^[248] und Tenside^[249-256] oder durch chemische Modifizierung der Nanopartikeloberfläche^[257], kann die Partikelverteilung *in vivo* wesentlich verändert werden^[4]. Bei kolloidalen Partikeln sind die Partikelgröße und zusätzlich die Oberflächeneigenschaften ausschlaggebend für die Verteilung *in vivo*^[4,258-260]. Die Nanopartikel werden mit Serum-Opsoninen kurz nach

Serumkontakt belegt^[4,258]. Um die phagozytäre Aufnahme der Nanopartikel durch Makrophagen oder ihre Interaktion mit dem Immunsystem zu begünstigen, umschließen Serumbestandteile, die sogenannten Opsonine, die eindringenden Fremdpartikel^[4,258]. Partikel mit unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften adsorbieren unterschiedliche Opsonine, d.h., dass die Art des adsorbierten Opsonins abhängig von den Oberflächeneigenschaften der Partikel ist^[4,258]. Beschichtete Partikel adsorbieren wesentlich weniger aber bestimmte Opsonine, wohingegen die Adsorption auf unbeschichteten Partikeln eine größere Vielzahl von Opsoninen zulässt^[4,258]. Eine Verminderung der Opsonisierung, sowie eine Verringerung der nanopartikulären Beseitigung durch RES-Aufnahme, können durch Verlängerung der Zirkulationszeit der Nanopartikel im Blut und Verbesserung des *Drug Targeting* mittels biomimetisch-veränderter Nanopartikeloberfläche oder sterischer Stabilisierung von Nanopartikeln realisiert werden^[247]. Die Opsonisierung im Blutstrom wird bei sterisch-stabilisierten Nanopartikeln aufgrund ihrer hydrophileren Partikeloberfläche verhindert^[247]. Dies kann auf der Nanopartikeloberfläche durch Einsatz von Block-/Branched-Copolymeren und Adsorption von hydrophilen Tensiden erfolgen^[247,261]. Die erfolgreichsten nichtionischen hydrophilen Polymere, die für diese Anwendung verwendet werden, sind Polyethylenoxid (PEO) oder Polyethylenglycol (PEG)^[247,261,262].

Durch zielgerichtetes adäquates *Coating* für die jeweilige pharmazeutische Applikation kann die Phagozytose unterdrückt oder sogar ausgeschlossen werden, so dass die verabreichten Agentien in ausreichender Quantität und Geschwindigkeit am Wirkort mit möglichst minimierten Nebenwirkungen ankommen. Eine Maskierung und/oder ein *Coating* von Wirkstoffträgersystemen ist in puncto Bioverfügbarkeit ein verbessertes *Drug Delivery*- und *Drug Targeting*-System für eine patientengerechtere Medikation.

Die weitestgehend tensidumschlossene Kapselhülle der PnBCA-PFD-Nanokapseln supprimiert gut die endozytären Vorgänge des RES, wie die Phagozytose. Ein *Drug Targeting* ist bei diesen Nanokapseln momentan noch nicht etabliert worden. Die derzeit entwickelten und applizierten Kapseln sollen möglichst systemisch ihre respiratorische Transportwirkung entfalten. Eine lokale Anreicherung von Nanokapseln in sauerstoff-unterversorgten Arealen wäre, nach entsprechender Oberflächenfunktionalisierung, gut denkbar. Ebenso könnten als *Drug Carrier* nach Einkapselung von pharmazeutischen Wirkstoffen oder Therapeutika, wie von Insulin oder Antikarzinogenen, die polymeren Nanokapseln benutzt werden.

3. Experimenteller Teil

3.1 Synthese und Aufreinigung der PnBCA-PFD-Nanokapseln

Dieses Nanokapselsystem hat seine Anfänge in der 2009 von N. Al Khouri Fallouh entwickelten Originalsynthese (unveröffentlicht). Die organische Phase bestand ursprünglich aus 200 μL *cis*-, *trans*-Perfluordecalin, 1 mL Chloroform, 1 mL Dichlormethan, 10 mL Aceton, 0,0610 g Synperonic[®] PE/F68, 38 mL Ethanol und aus 100 μL des Monomers *n*-Butylcyanoacrylat, das auf dem technischen Sekundenkleber Sicomet[®] 6000 (Henkel[®]) basierte. Die wässrige Phase umfasste 50 mL deionisiertes Wasser und 0,25 g Synperonic[®] PE/F68.

Auf dieser Synthesebasis wurden alle weiteren Syntheseoptimierungen unternommen. Die optimierten tensid- und monomerreduzierten Synthesen erfordern, wie die Originalsynthese, zwei Phasen: eine organische und eine wässrige Phase. Die Standardsynthese wird, wie folgt, unter den folgenden Bedingungen durchgeführt; der apparative Aufbau ist anhand von Abb. 12 zu entnehmen.

Bei der organischen Phase wurden zu 200 μL *cis*-, *trans*-Perfluordecalin, 2 mL Dichlormethan, 10 mL Aceton, 0,0122 g des sterisch stabilisierenden Tensids Synperonic[®] PE/F68, das als Solubilisator für das *cis*-, *trans*-Perfluordecalin verwendet wurde, 38 mL Ethanol und 10 μL des Monomers *n*-Butylcyanoacrylat, das auf dem medizinischen Gewebeklebstoff Indermil[®] (Henkel[®]) basiert, unter starkem Rühren zugegeben. Der Bestandteil Chloroform^[263-265], der in der Originalsynthese eingesetzt wurde, wurde in der optimierten Synthese durch Dichlormethan in der gleichen Menge substituiert, um Sicherheitsrisiken, die von basenkatalysierten Reaktionen ausgehen könnten, zu verhindern. Nach vollständigem Lösen des PFD in der organischen Phase, wurde die Lösung bei einer Temperatur von etwa 20 °C mittels eines Tropftrichters mit einem Volumenstrom von ca. 1 mLs⁻¹ in die wässrige Phase, die aus 100 mL deionisiertem Wasser¹ und aus 0,10 g des Tensids Synperonic[®] PE/F68 bestand, unter ebenso starkem Rühren überführt. Die Nanokapseldispersion erfuhr dabei einen leichten Temperaturanstieg, d.h. dass es sich vermutlich um eine exotherme Reaktion handelte. Diese Mischungswärme verursachte einen Temperaturanstieg von $2-4 \pm 0,5$ K, der innerhalb der Dispersion detektierbar war.

¹ Universität Duisburg-Essen, elektrische Leitfähigkeit $\sigma = 0,7 - 0,9 \mu\text{Scm}^{-1}$

In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 12) sind die zugrunde liegenden Prozessschritte und Details chronologisch am Beispiel eines 40-fachen Ansatzes zusammengefasst:

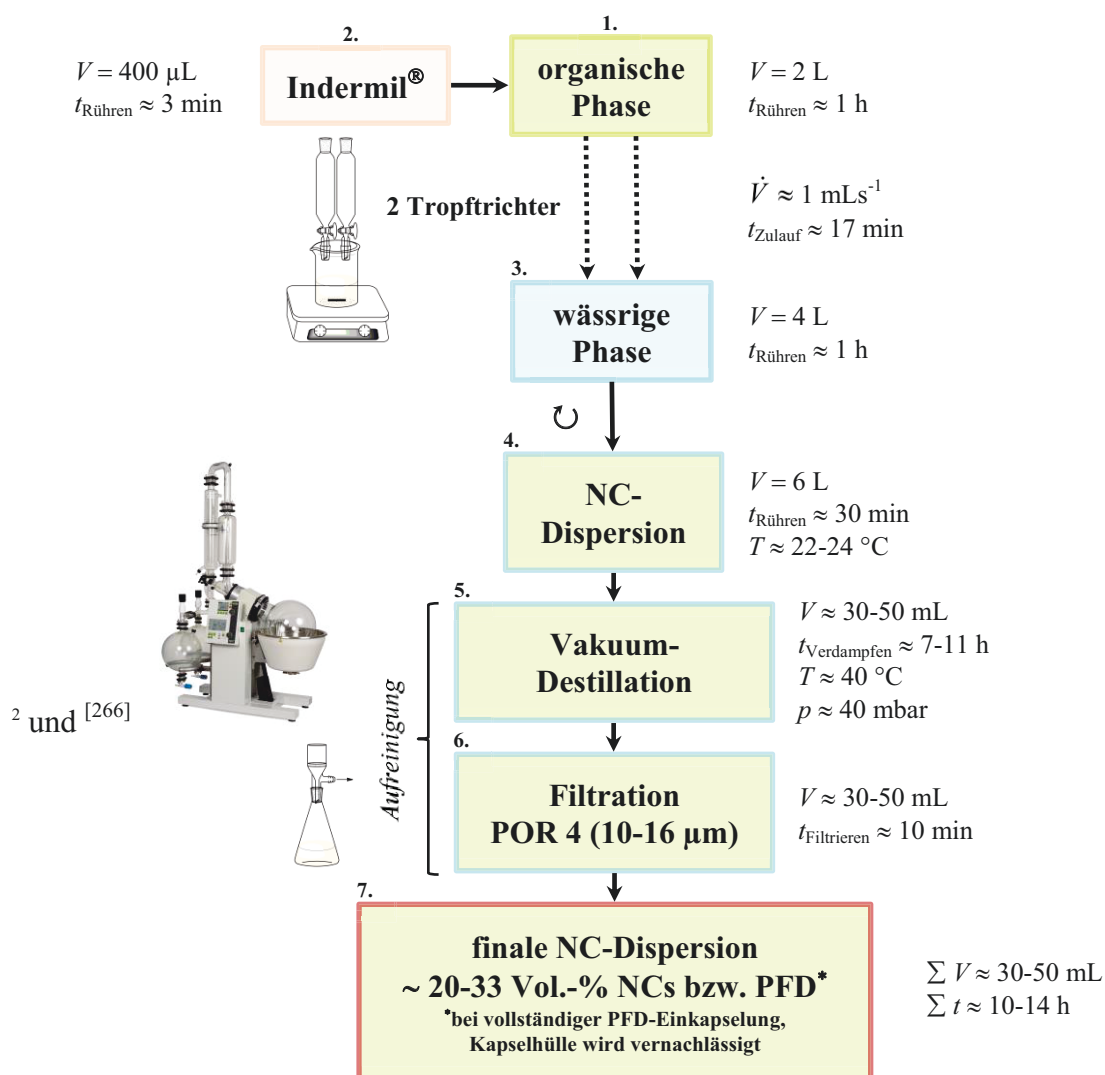


Abb. 12: Schematischer Aufbau der Syntheseapparatur und Fließschema der unterschiedlichen konsekutiven Stufen der PnBCA-PFD-Nanokapselherstellung anhand eines 40-fach hochskalierten Ansatzes.

Nach Abdampfen eines großen Teils der fluiden Phase, wurden etwa 30-50 mL eines milchig-weißen Kapselkonzentrats von hoher Viskosität (vgl. Abb. 72) erhalten. Abschließend wurde die eingegangte Nanokapseldispersion mit einem Glasfiltertiegel der Porengröße POR 4 (10-16 μm) filtriert, um größere Kapseln, Agglomerate und Polymerflocken zu eliminieren.

² ansatzoptional Rotavapor 110, Fa. BÜCHI oder Rotavapor R-153 mit Vakuum-System B-172 und Vakuum-/Destillationskontrolleinheit B-168, Fa. BÜCHI mit Kühler DFK 2000 A, Fa. colora;
 Photo vom BÜCHI Rotavapor R-220 SE, mit freundlicher Genehmigung der BÜCHI Labortechnik GmbH, Essen

3.2 Anfärbung des *cis*-, *trans*-Perfluordecalin-Kerns der PnBCA-PFD-Nanokapseln

Ein ähnliches Vorgehen wie bei der Standardsynthese wurde auch bei den angestrebten Fluoreszenzexperimenten durchgeführt, nur mit dem Unterschied, dass 10 mg eines fluorierten Fluoreszenzfarbstoffes zur PFD-enthaltenen organischen Phase zugegeben wurden, um fluoreszierende Kapselkerne zu erhalten. Die zur Anfärbung der Kapselkerne eingesetzten fluorierten Fluoreszenzfarbstoffe sind Derivate des Porphyrins^[267], nämlich 5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-Porphyrin und seine Komplexe mit Palladium(II), Platin(II) oder Eisen(III), die diese Schwermetallionen im Zentrum des Porphyrinringsystems chelatisieren. Es wurden auch andere Fluoreszenzfarbstoffe dazu ausprobiert, wie z.B. Nilrot, jedoch erwiesen sich diese eher geeignet um die recht dünne Kapselhülle anzufärben und daher ergab sich zu wenig Signalintensität in anstehenden Untersuchungen. Aufgrund des ähnlichen Fluorierungsgrades wie beim PFD stellten sich die o.g. Porphyrin-Derivate als geeignet heraus.

Nach der Synthese wurde ein Teil der fluoreszenzmarkierten Kapseldispersionen direkt mittels SR-SIM (*Superresolution Structured Illumination Microscopy*) untersucht. Hingegen wurde ein anderes Volumen der Kapseldispersionen für die SR-SIM-Untersuchungen Waschschritten zugeführt, um einen möglichen Überschuss an Farbstoffmolekülen zu eliminieren, d.h., dass 1 mL der Kapseldispersion dreimal zentrifugiert wurde (MiniSpin, 4.000 rpm, 5 min). Unmittelbar nach jedem Zentrifugationsschritt wurden die Kapselpellets gewaschen, gemischt und final in deionisiertem Wasser aufgenommen.

3.3 Variation, Maßstabsvergrößerung und Langzeitstabilität der *Pn*BCA-PFD-Nanokapseln

Die Einstellbarkeit der Nanokapselgröße ist ein wichtiger Aspekt im Hinblick auf medizinische Applikationen.

In Bezug auf die Anwendung der *Pn*BCA-PFD-Nanokapseln in biologischen Systemen resultiert das Erfordernis, große Mengen an optimierten Nanokapseln in einem Ansatz bereitzustellen, um den Sauerstofftransport zu unterstützen. Angesichts dieser Tatsache, wurden unterschiedliche Parameter in der Synthese ausgelotet und überprüft, ob eine Einstellbarkeit der Kapselgrößen und darüber hinaus eine Hochskalierung dieser Synthese möglich sind.

Zur Herstellung größerer Mengen von *Pn*BCA-PFD-Nanokapseln für medizinische Experimente und Anwendungen ist eine Hochskalierung der Standardsynthese erfolgreich implementiert worden. Die Maßstabsvergrößerung ist in 10-, 20-, und 40-fachen Vergrößerungsstufen in Bezug auf die Standardsynthese vollführt worden. Dabei wurden für den selbsttätigen organischen Lösungsmitteltransfer zwei Tropftrichter verwendet, die simultan die organische Phase in die wässrige Phase einführen. Für die 40-fach vergrößerten Ansätze, die für die Rattenleberperfusionen und die intravenösen Infusionen eingesetzt wurden, wurden im Projekt abweichend von der 40-fachen Skalierung pro Ansatz 10 mL PFD statt 8 mL und 500 μ L Monomer statt 400 μ L eingesetzt, um eine optimale Sauerstoffversorgung im Experiment zu gewährleisten. Auf diese Weise sollte die Kapselkonzentration für die medizinischen Experimente erhöht werden. Außerdem wurde durch den Einsatz von geringeren Lösungsmittelmengen für die Nanokapselsynthese auch ein Beitrag zur Einsparung von Chemikalien und somit auch zur Kostenreduzierung und Ressourcenschonung geliefert. Alle anderen Synthese- und Prozessparameter der 40-fachen Prozesserweiterung waren, wie in Abb. 12 dargestellt, unverändert geblieben.

Referenz- und Ausgangspunkt des Variationsvorhabens war die Standardsynthese der *Pn*BCA-PFD-Nanokapseln mit der Bezeichnung Nr. 1 (Kap. 3.1), deren Größenhistogramm unmittelbar nach der Synthese in Abb. 43 gezeigt ist und eine relativ monodisperse Kapselverteilung repräsentiert. Anhand dieses Ansatzes wurden vergleichend Syntheseparameter, wie Temperatur und Konzentration, variiert, um die optimalen Reaktionsbedingungen herauszufinden.

Weiterhin wurden, anhand dieser variierten Synthesen, mehrere Langzeitstabilitätstests bei der üblichen Lagertemperatur von $4 \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Kühlschrank) durchgeführt, um die Lagerungsfähigkeit bzw. Haltbarkeit der Kapselsysteme zu dokumentieren.

3.4 Vorbereitung für das *Nanoparticle Tracking*

Schaertl und Sillescu^[268] untersuchten die dynamischen Eigenschaften von Kolloiden in dünnen wässrigen Suspensionsschichten mithilfe der Lichtmikroskopie und computergestützter digitaler Bildverarbeitung. Wie diese Kolloide, weisen auch die kolloidalen PnBCA-PFD-Nanokapseln während der mikroskopischen Beobachtung ein sphärisches Festkörperverhalten auf^[268]. Zur Vermessung dieser Hartkugelloide mittels Dunkelfeldmikroskopie und *Nanoparticle Tracking* wurden hydrophobe Objektträger und Deckgläser verwendet. Da es sich hierbei um hydrophile Glasoberflächen handelt, war eine Hydrophobierung zur Vermeidung von Interaktionen zwischen den Kolloiden und den Glasoberflächen notwendig^[268]. Außerdem wurde dadurch der Einfluss dieser Oberflächen, z.B. durch die Diffusion von Ionen aus dem Glas in die Dispersion, minimiert^[268]. Vor der Beschichtung der Glaträger wurden diese mit konzentrierter Schwefelsäure gereinigt bzw. angesäuert^[268], mit deionisiertem Wasser gewaschen, mit Papiertüchern getrocknet und mit Druckluft von Rückständen befreit. Unter einer trockenen Stickstoffatmosphäre (Glovebox) wurden die gereinigten Glaträger mit Octadecyltrichlorsilan (OTS) benetzt^[268]. Die dabei bewirkte Funktionalisierung der Glasoberfläche ist in folgender Abbildung (Abb. 13) illustriert:

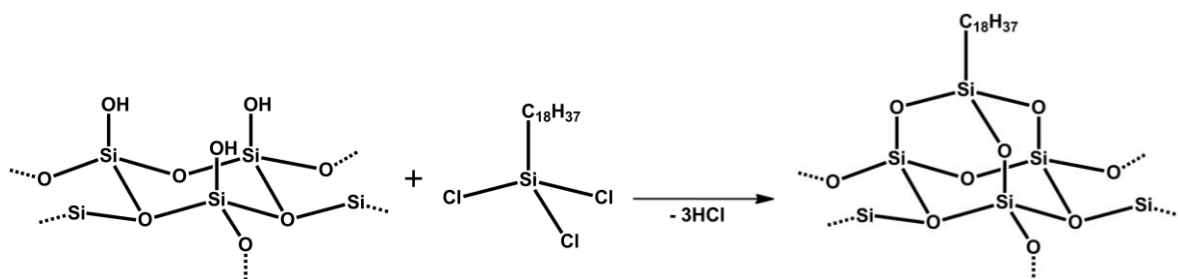


Abb. 13: Silanisierung der in der Dunkelfeldmikroskopie verwendeten Glasoberflächen.

Das OTS reagiert in einer Kondensationsreaktion mit oberflächenassoziierten OH-Gruppen, wobei gasförmiger Chlorwasserstoff freigesetzt wird^[269-271], welcher einen großen Beitrag zur Entropie entrichtet. Dies und die Bildung von stabilen Si–O-Bindungen sollte auch die

Triebkraft dieser Reaktion ausmachen und das Gleichgewicht stark zugunsten der konvertierten Oberfläche verschieben. Abschließend wurden die Glasträger nach Ablauf einer nächtlichen Inkubationsphase mit *n*-Hexan von den großflächig anhaftenden Silan-Beschichtungsresten befreit^[269-272].

Bevor eine Messung mit dem *Nanoparticle Tracking* durchgeführt wurde, erfolgte eine entsprechende Verdünnung der hochkonzentrierten Nanokapseldispersion, um eine Unterscheidbarkeit der Einzelpartikel und die Detektion ihrer Trajektorien zu gewährleisten.

Bei der Wahl des Verdünnungsmediums zur Messung der PnBCA-PFD-Nanokapseldispersionen war zu beachten, dass keine zu hohe Konzentration oder eine wesentlich höhere Viskosität als Wasser verwendet wurde, da die Brownsche Molekularbewegung unbeeinflusst bleiben sollte. Außerdem musste eine Destabilisierung der Dispersion vermieden werden. Die Brechungsindizes von *cis*-, *trans*-Perfluorodecalin ($n_D^{25} = 1,313$ ^[37], $n_D^{25} = 1,31$ ^[273], $n_D^{20} = 1,3147$ ^[274]) und von Wasser ($n_D^{25} = 1,33287$ ^[275], $n_D^{20} = 1,33335$ ^[275]) sind einander recht ähnlich, wodurch sich ein ungünstiger Strahlengang für das von den Partikeln gestreute Licht im Mikroskop ergab. Die Partikel wurden intensitätsschwächer auf dem CCD-Chip abgebildet und es resultierte daher ein schlechter Kontrast im Bild. Dieser Effekt wurde durch einen größeren Unterschied in den Brechungsindizes, und zwar durch das Verdünnen der Proben mit einer 5 Gew.-%igen Magnesium(II)chlorid Hexahydrat-Lösung ($n_D^{20} = 1,3457$; selbst bestimmt, in Übereinstimmung mit Quelle^[276]), weitgehend vermieden.

Um eine Nanokapseldispersion mit der etablierten *Nanoparticle Tracking*-Methode zu vermessen, war eine Dünnschichtpräparation erforderlich. D.h., dass auf einen hydrophobierten Objektträger (s.o.) ein Dispersionstropfen mittig aufgebracht wurde, der anschließend mit einem hydrophob beschichteten Deckglas bedeckt wurde. Um eine möglichst einheitlich dünne und homogene Schichtdicke zu erhalten, wurde das Präparat mit Gewichten belastet und die überschüssige ausgetretene Dispersion mit einem Papiertuch aufgenommen. Zur Versiegelung des Präparats, wurde geschmolzenes Kerzenwachs an den Deckglasrändern aufgebracht. Durch diesen Abschluss wurde eine Austrocknung der Probe verzögert und daraus resultierende Strömungen und Beeinträchtigungen durch ambiente Luftzirkulation weitgehend vermieden, was zusätzlich durch eine Präparatabdeckung bewerkstelligt wurde. Ferner wurde bei der Dünnschichtpräparation darauf geachtet, dass möglichst keine Luftbläschen in die aufgetropfte Dispersion gelangten, die Strömungserscheinungen verursachen können.

Erst durch Begünstigung dieser Voraussetzungen, ist es möglich die native Brownsche Molekularbewegung der Partikel zu studieren.

3.5 Viskosität und Ostwald-Viskosimetrie

Die Sauerstoffversorgung von den Erythrozyten hin zu den Geweben wird durch das Fließverhalten der Erythrozyten im mikrovaskulären Netzwerk beeinflusst^[277]. Die rheologischen Eigenschaften der Erythrozyten haben direkte Einflussnahme auf die Hämodynamik in der Mikrozirkulation des Blutes^[277]. Die Blutviskosität *in vivo* kann basierend auf dem Hagen-Poiseuille'schen Gesetz^[278-280] als laminare Strömung eines homogenen Fluids bei konstantem Durchmesser des Gefäßes vereinfacht beschrieben werden^[281], dabei ist der Volumenstrom des Fluids in einem als Rohr idealisierten Blutgefäß umgekehrt proportional zur Viskosität^[277].

Das Blut ist eine Nicht-Newton'sche Flüssigkeit, dies lässt sich durch die Inkonzanz der Blutviskosität und die Abhängigkeit von der Scherrate begründen^[277]. Die Viskosität trägt außerdem zur Scherbeanspruchung endothelialer Zellen bei^[282]. Die immanenten Blutbestandteile und ihre Fließeigenschaften mit ihren komplexen Wechselwirkungen untereinander, sowie der Hämatokrit^[281,283] und der Gefäßdurchmesser^[283-288], sowie die Scherrate, d.h. der Geschwindigkeitsgradient in einem sich bewegenden Fluid, sind Einflussfaktoren auf die Viskosität des Blutes^[277].

Die Ostwald-Viskosimetrie^[289-291] wird für die Viskositätsbestimmungen herangezogen. Das verwendete Ostwald-Kapillarviskosimeter (Blaubrand® Duran®, 75-100 s) besteht aus einem U-Rohr, das an beiden Enden offen ist und sich einseitig zu einer Kapillaren verzweigt. Nach Befüllen des Viskosimeters mit Probenflüssigkeit bis oberhalb der oberen Kalibrationsmarke am Messreservoir (z.B. mit Hilfe eines Peleusballs), stellt sich eine Strömung aufgrund des bestehenden hydrodynamischen Drucks ($\Delta p = \rho g \Delta h$) nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille^[278-280] in Richtung eines Vorratsreservoirs ein. Es wird die benötigte Zeit Δt gemessen, die der Meniskus des strömenden Mediums benötigt, um von der einen bis zur zweiten unteren Kalibrationsmarke zu gelangen (definiertes Volumen). Während der Messung ändert sich jedoch auch der Flüssigkeitsmeniskus auf anderen Seiten des U-Rohrs und dadurch auch der hydrostatische Druck. Folglich muss bei dieser Methode immer gegen ein Fluid bekannter Viskosität referenziert werden, in diesem Falle Wasser (mit der interpolierten

Viskosität $\eta_{\text{H}_2\text{O}}^{37^\circ\text{C}} = 0,727643 \text{ mPa} \cdot \text{s}^{[275]}$ und der pyknometrisch bestimmten Dichte $\rho_{\text{H}_2\text{O}}^{37^\circ\text{C}} = 0,9918 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$), mit dem die bestimmte relative Viskosität in eine absolute Größe anhand folgender Beziehung^[214] umgerechnet werden kann:

$$\eta_{\text{rel}} = \frac{\eta_{\text{Probe}}}{\eta_{\text{H}_2\text{O}}} = \frac{\Delta t_{\text{Probe}} \cdot \rho_{\text{Probe}}}{\Delta t_{\text{H}_2\text{O}} \cdot \rho_{\text{H}_2\text{O}}} \quad (\text{Gl. 2})$$

Alle Messungen fanden bei 37 °C statt, daher wurden die Proben vor den Messungen in einem Wasserbad entsprechend temperiert. Die Nanokapseldispersionen wurden dabei mit unterschiedlichen Mengen KH-Puffer³ verdünnt, um eine Vergleichbarkeit zu den medizinischen Experimenten zu gewährleisten. Ebenfalls wurden die Dichten aller Proben bei 37 °C mit einem Pyknometer bestimmt.

³ I: 12,5 mL 2,3 M NaCl-Stammlösung (134,4 gL⁻¹)
 II: 12,5 mL 0,5 M NaHCO₃-Stammlösung (42,0 gL⁻¹)
 III: 12,5 mL Mischung aus unterschiedlichen Stammlösungen:
 0,118 M KCl (8,8 gL⁻¹), 23,6 mM MgCl₂·6H₂O (4,8 gL⁻¹), 24,6 mM NaH₂PO₄·H₂O (3,4 gL⁻¹), 23,9 mM Na₂SO₄ (3,4 gL⁻¹)
 IV: 12,5 mL 50 mM CaCl₂·2H₂O-Stammlösung (7,35 gL⁻¹)
 V: 5,0 mL 1 M HEPES-Stammlösung (238,3 gL⁻¹)
 Alle Lösungen wurden steril filtriert und autoklaviert, sowie bei 4 °C gelagert.

4. Methodenteil

4.1 Dunkelfeldmikroskopie und das *Nanoparticle Tracking*

Mithilfe der Dunkelfeldmikroskopie und dem im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Christian Mayer entwickelten *Nanoparticle Tracking* erfolgt eine zweidimensionale Spurverfolgung, bei der Radien und Radienverteilungen zwischen 50 und 500 nm^[292] von Nanopartikeln im dispergierten Zustand bestimmt werden können.

Die Dunkelfeldmikroskopie ist so alt wie die Geschichte der Mikroskopie selbst; schon im 17. Jh. verwendeten *van Leeuwenhoek*, *Hooke* und *Huygens* diese mikroskopische Methode^[293]. Im Jahre 1837 spricht *Reade*^[294] zum ersten Mal von einer „*Background Illumination*“^[295]. Grundlage der Dunkelfeldmikroskopie ist die Lichtstreuung submikroskopischer Objekte, die 1868 von *Tyndall* entdeckt wurde^[296] (Tyndall-Effekt) und dazu ausgenutzt wird, eine Kontrasterhöhung in der Lichtmikroskopie zu erzielen^[293]. Das Beleuchtungssystem ist dabei so zu justieren, dass die abgelenkten Lichtstrahlen (gestreutes oder gebeugtes Licht erster und höherer Ordnung), aber nicht die unabgelenkten direkten Strahlen (gebeugtes Licht der nullten Ordnung) mit dem Linsensystem eines Objektivs gesammelt werden^[293,297,298], wie es in folgender Abbildung (Abb. 14) dargestellt ist:

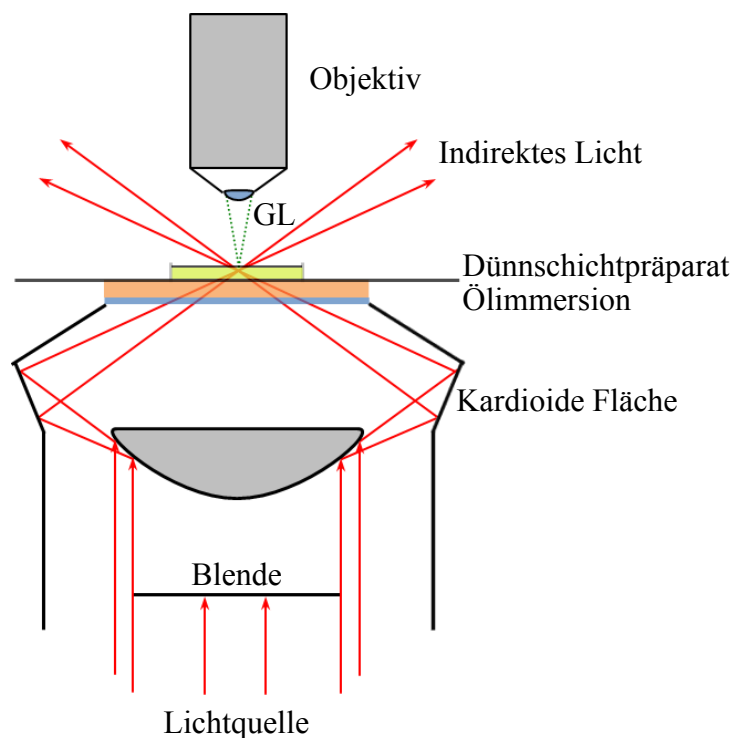


Abb. 14: Schematische Darstellung der Strahlengänge in einem Dunkelfeldmikroskop mit Kardioide-Kondensor, GL = Gestreutes Licht, modifiziert nach Lit.^[293].

Üblicherweise wird die Probe in der Dunkelfeldmikroskopie mit einem hohlkegelförmigen Lichtstrahlenprofil beleuchtet^[293]. Spezielle Kondensoren sind dafür entwickelt worden^[293], wie der 1909 von *Siedentopf* entwickelte Kardioid-Kondensor^[299,300]. Wasser oder Immersionsöl können zwischen dem Kondensor und dem Objektträger aufgebracht werden, die die Brechung an der Luft-Glas-Grenzfläche reduzieren und somit die Auflösung verbessern^[293]. Das Bild wird dadurch rekombiniert, dass die Lichtstrahlen an optisch dichteren Bestandteilen der Probe gestreut bzw. gebrochen werden und dabei hell erscheinen, während hingegen das umgebende fluide Medium dunkel erscheint^[293]. Je geneigter die eingestrahlten Lichtstrahlen sind, desto sensitiver werden kleine Objekte detektiert^[293]. Die Obergrenze der Neigung ist gegeben, wenn die einfallenden Lichtstrahlen lotrecht zur optischen Achse des Mikroskops positioniert sind^[293].

Die Dunkelfeldmikroskopie ist damit auch zur Visualisierung von Partikeln befähigt, deren Größe deutlich kleiner als die der Abbe'schen^[301] Auflösungsgrenze ist^[293], indem man dieses Problem durch die selektive Detektion der Streustrahlung umgeht. Die Detektionsgrenze in einem Dunkelfeldmikroskop ist durch die detektierten Intensitäten zwischen dem Objekt und dem Hintergrund festgelegt^[293]. Bei den gemessenen Dispersionen ist dieser Kontrast optimal, da die Intensität der Mie-Streuung^[302] der Partikel in der Regel um Größenordnungen gegenüber der Rayleigh-Streuung^[303] des Mediums überwiegt.

1926 erhielten *Zsigmondy*^[304] und 1927 *Svedberg*^[305] den Nobelpreis für Chemie; sie legten das Fundament für die Radienbestimmungen von Kolloiden.

Die erste im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Christian Mayer etablierte Partikelverfolgung ist das *Particle Tracking*^{[269-272,292]4}. Dieses Vorläufermodell legte den Grundstein für alle nachfolgenden Bestrebungen. Die Partikelverfolgung wurde hinsichtlich der Partikelerkennung und -detektion weiterentwickelt und hard- und softwaretechnisch optimiert⁵ (unveröffentlicht, Dissertationen von *S. Beuermann* und *J. Linders*). In Bezug auf das Vorgängermodell wurden einige Arbeitsschritte automatisiert und optimiert. Mit der verfeinerten Auswertemethode können ebenfalls, anhand der Verfolgung der zurückgelegten Strecken einzelner Partikel, Radienverteilungen in einer Dispersion bestimmt werden. Das *Motion Tracking* der Partikel ist gekennzeichnet durch die Bildakquise am

⁴ Das erste im Arbeitskreis etablierte *Nanoparticle Tracking (Dynamic Nanosizing Microscopy, DNM)* war das folgende: Dabei handelt es sich um ein Dunkelfeldmikroskop (Biolar, PZO Polen) mit einem Kardioidkondensor (Apertur N_A 1.2-1.4, Ölimmersion, PZO Polen) und einem Objektiv (Apertur N_A 0.75, 40-fache Vergrößerung, Wasserimmersion, achromatisch, JIOMO), einer 250 W-Halogenlampe (Osram), einer CCD-Kamera (KP-F1 E/K, Hitachi), einer Framegrabberkarte Oculus F/64-DSP (Coreco) und einer Bildverarbeitungssoftware PicColor 3.3 (Fibus) mit angeschlossenem Windows-basiertem PC und entsprechender Microsoft Excel- und Origin®-Analyse- und Auswertesoftware.

⁵ Beim verbesserten *Nanoparticle Tracking (Advanced Nanoparticle Tracking, ANT)* handelt es sich um ein Dunkelfeldmikroskop (Leitz) mit einem Kardioidkondensor (UV 1.2-1.4, Ölimmersion, TIYODA) und einem Objektiv 170/0.17 Pl 40/0.65 (Leitz), einer 100 W-Halogenlampe Typ MTR 27 (Wild Heerbrugg) und einer Kamera FireWire-CAM-011H (PHYTEC) mit angeschlossenem Linux-basiertem PC und entsprechender C-, GTK+-, unicap- und GSL-basierter Analyse- und Auswertesoftware.

Dunkelfeldmikroskop mit einer installierten CCD-Kamera und einer speziell entwickelten Software, die die Aufnahme und Nachbearbeitung der digitalen Bilder realisiert^[269-272,292]. Nach finaler Bildrestauration, werden die erzielten Bilddaten ausgewertet und abgespeichert^[269-272,292]. Bei der Bewegungsanalyse der Partikel werden statische Bilddaten, wie Verschmutzungen und Kratzer im Präparat, eliminiert^[270]. Die Partikelverfolgung erfolgt anhand von definierten Konturkriterien der Partikel unter Zuhilfenahme eines Helligkeitsschwellenwertes^[270]. Die Einzelpartikel werden zwischen dem ersten Auftreten im Bildausschnitt und der Fortbewegung innerhalb der Sequenz in Bezug auf die x-, y-Koordinaten korreliert^[270]. Die Bewegungsspur eines jeden Partikels wird während der Aufnahmesequenz analysiert und die Partikelgröße wird anhand des ermittelten Verschiebungsquadrates berechnet (s. Gl. 5)^[270]. Die finale hydrodynamische Radienverteilung wird abschließend durch Kumulieren der sequenziellen Einzelpartikelauswertungen erhalten.

Das sogenannte *Nanoparticle Tracking* beruht auf der inhärenten Brownschen Molekularbewegung von Partikeln in Flüssigkeiten, die von *Brown*^[195] zuerst beobachtet und beschrieben wurde. Die Brownsche Molekularbewegung wurde unabhängig voneinander von der nach *Einstein*^[196,306] und von *Smoluchowski*^[197] aufgestellten molekularkinetischen Theorie der Wärme beschrieben. Beim *Nanoparticle Tracking* wird die Brownsche Molekularbewegung der untersuchten Einzelpartikel in einem Partikelensemble analysiert. Mittels dieses *Motion Tracking*, kann die Verfolgung der Trajektorien der Nanopartikel anhand der zeitaufgelösten Lokalisation ihrer Massenschwerpunkte durch Determination ihrer Verschiebungsquadrate im zweidimensionalen Beobachtungsbereich erfolgen. Ausgehend vom ersten Fick'schen Gesetz^[172-174] und der Kombination der Diffusionskoeffizienten der Einstein-Smoluchowski-Gleichung (Gl. 3) und der Stokes-Einstein-Gleichung (Gl. 4) resultiert das Verschiebungsquadrat der Partikelbewegung, aus dem der hydrodynamische Radius (Gl. 5) bestimmt wird.

Einstein-Smoluchowski-Gleichung

$$D = \frac{\Delta^2}{2t} \quad (\text{Gl. 3})$$

Stokes-Einstein-Gleichung

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_H} \quad (\text{Gl. 4})$$

hydrodynamischer Partikelradius

$$r_H = \frac{kTt}{3\pi\eta\Delta^2} \quad (\text{Gl. 5})$$

D : Diffusionskoeffizient, Δ^2 : Quadrat der eindimensionalen Partikelverschiebung während der Diffusionszeit t , k : Boltzmann-Konstante, T : Temperatur, η : Viskosität des Dispersionsmediums, r_H : hydrodynamischer Partikelradius

4.2 PnBCA-PFD-Nanopartikel-Charakterisierung

Bei den PnBCA-PFD-Nanopartikeln handelt es sich, je nach Syntheseparametern und Vorliegen der nanopartikulären Spezies, um ein relativ monodisperses monoformes^[194] oder polydisperses polyformes^[194] System, das aus sphäroidischen Polymerhohlkörpern (Nanokapseln), sphäroidalen Polymervollkörpern (Nanosphären) und irregulären Polymerflocken bestehen kann.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der SEM (*Scanning Electron Microscopy*) (Abb. 15), ESEM (*Environmental Scanning Electron Microscopy*) (Abb. 16) und der Cryo-TEM (*Cryo-Transmission Electron Microscopy*) (Abb. 17-Abb. 20) zeigen die sphärische Morphologie der synthetisierten Partikel, sowie die gewünschte Nanokapselhohlkörperstruktur. Diese Aufnahmen veranschaulichen auch eine Kapselwandstärke von nur einigen wenigen Nanometern, die damit prinzipiell auch einen guten Gasaustausch unterstützen kann. Wie bereits in Abschnitt 3.2 erwähnt, wurden auch Fluoreszenz-Experimente mit Nanokapseln durchgeführt, um in späteren Versuchen ihr Verhalten, z.B. in Geweben, analysieren zu können. Der experimentelle Erfolg wurde mittels SR-SIM (*Superresolution Structured Illumination Microscopy*) untersucht (s. Abb. 30-Abb. 32), die ebenfalls die kugelförmige Gestalt belegt.

4.2.1 SEM und ESEM

Die SEM- und ESEM-Aufnahmen der PnBCA-PFD-Nanokapseln wurden von Herrn Dipl.-Ing. Smail Boukercha im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Matthias Epple am Institut für Anorganische Chemie an der Universität Duisburg-Essen mit dem 400 FEG QUANTA-Elektronenmikroskop von der FEI Company aufgenommen. Dies ist ein digitales hochauflösendes Feldemissions-Low Vacuum/ESEM-Rasterelektronenmikroskop, welches ein EDAX EDS-Analysensystem Typ „Genesis 4000“ besitzt.

Für die SEM-Aufnahme in Abb. 15 wurde eine verdünnte, 20-fach hochskalierte Nanokapseldispersion auf ein Si-Waferquadrat mit darunter befindlichem Probehalter pipettiert und trocknen gelassen. Dieses Trocknungs- bzw. Sedimentationspräparat wurde vor der SEM mit einem etwa 4 nm dicken Au-Pd-Film besputtert. Anschließend wurden die Kanten des Präparates mit Silberleitlack bestrichen und das Präparat in die Probenkammer des Mikroskops transferiert.

Die Abb. 15 zeigt eine Übersicht an Hohlstrukturen, dabei führte der abrasternde Elektronenstrahl vermutlich eine Artefaktbildung herbei.

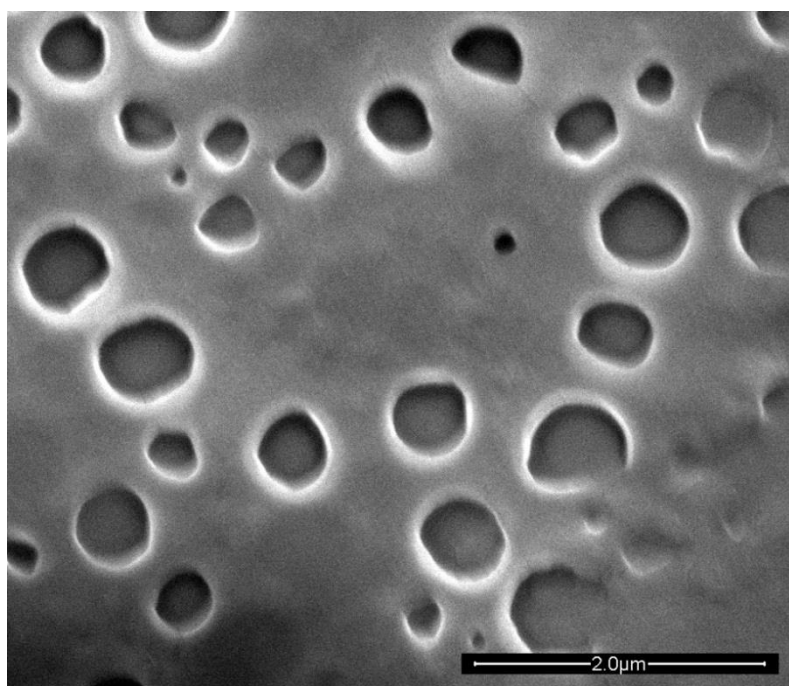


Abb. 15: SEM-Aufnahme eines 20-fach hochskalierten Ansatzes einer PnBCA-PFD-Nanokapseldispersion in 50.000-facher Vergrößerung (10 kV).

Das eingekapselte PFD besitzt einen hohen Dampfdruck, der sich besonders unter den Hochvakuumbedingungen der SEM (ca. 10^{-5} mbar) bemerkbar macht. Es bleiben die „hauchdünnen“ Polymerhüllen zurück, die sich von der Umgebung abgrenzen. Eventuell

werden Reste des PFD in den (stabileren) Kapseln durch den voranschreitenden Trocknungsprozess und den über die Probe laufenden Elektronenstrahl zusätzlich verdampft. Die Kapseln und ihr Polymermaterial werden also, sowohl durch ihre Ausgasung als auch durch die destruiierende Wirkung des Elektronenstrahls, deformiert. Die residualen Hohlräume spiegeln somit die Lokalität der vermeintlich zuvor dort existenten Nanokapseln wider. Insgesamt ist diese Methode ungeeignet für die Untersuchung der Nanokapseln, daher wurde das schonendere ESEM-Verfahren nachfolgend angewandt.

Zur Aufnahme im ESEM-Modus (ca. 3 mbar und 2 °C) ist im Vorfeld keine Probenpräparation erforderlich. Die Nanokapseldispersion wurde unverdünnt auf einen Si-Wafer aufgebracht und abgerastert. Dabei zeigten sich, zwar unter verringertem Auflösungsvermögen aber dennoch deutlich, die intakten Kapselmorphologien. Zudem sind in Abb. 16 die Nanokapselhüllen und -wandstärken gut sichtbar; die Nanokapseldurchmesser betragen größtenteils um 500 nm. Trotzdem sind „nur“ Oberflächenabrasterungen möglich und keine plastischen Darstellungen bzw. fehlt es an „Tiefenwirkung“. Dies wäre in der SEM unter „normalen“ Umständen durch eine neigungswinkelabhängige Messung der Probe und eine anschließende 3D-Rekonstruktion möglich, wenn keine Artefaktbildung erfolgt. Im ESEM-Modus ist diese Möglichkeit durch das Verwenden eines Fluids nicht gegeben. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist, dass auf diese Weise nur tensidfreie Proben vermessen werden können, da die im Niedervakuum aufkommende Schaumbildung ansonsten die gefragte Probencharakteristik maskiert.

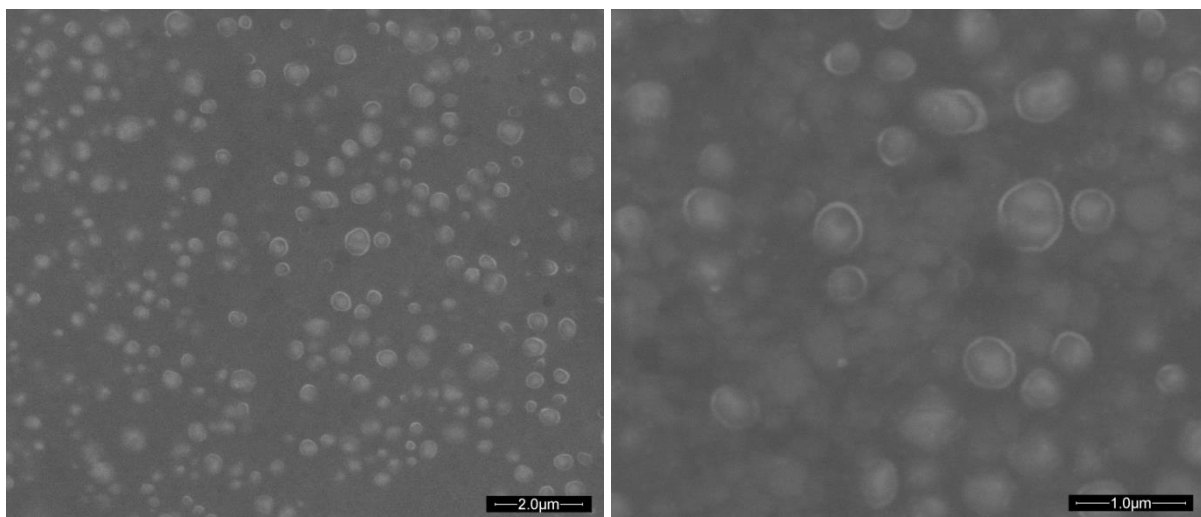


Abb. 16: ESEM-Aufnahmen einer tensidfreien PnBCA-PFD-Nanokapseldispersion, links in 20.000-facher Vergrößerung und rechts in 50.000-facher Vergrößerung (20 kV).

Insgesamt wird bei beiden elektronenmikroskopischen Verfahren deutlich, dass eine relativ schlechte Darstellbarkeit der Nanokapseln gegeben ist.

4.2.2 Cryo-TEM

Zur Aufnahme der Cryo-TEM-Aufnahmen wurde im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Rolf Schubert von Frau Sabine Barnert ein Transmissions-Elektronenmikroskop Leo 912 Ω -mega von der Leo Elektronenmikroskopie GmbH eingesetzt. Die verwendete Kamera war eine Proscan HSC 2 (Oxford Instruments), die Cryo-Transfervorrichtung arbeitete unter Stickstoffbegasung (Entwicklung Universität Freiburg) und die verwendeten Grids waren Quantifoil[®] S7/2 Cu 400 mesh, holey carbon films (Quantifoil Micro Tools).^[307]

Zur Redispergierung sedimentierter Nanokapseln wurde jede Probe vor der Messung intensiv durchgemischt. Die Nanokapselproben wurden unverdünnt vermessen, d.h. dass die eingeeengten Dispersionen der Cryo-TEM zugeführt wurden. Ein Tröpfchen, ca. 3 μ L, der Nanokapselprobe wurde auf ein mit Lochfolie befilmtes und mit Kohle bedampftes 400 x 100 mesh-Kupfernetz (Grid) aufgebracht. Nach Absaugen der überschüssigen Flüssigkeit mit Filterpapier wurde das Grid sofort in flüssiges Ethan (Kryogen, 90 K) eingebracht, schockgefroren und im Cryo-Probenhalter fixiert. Anschließend wurden die Präparate mithilfe einer Cryo-Transfervorrichtung in das TEM (120 keV) überführt. Bei niedriger Strahlenbelastung wurden die Präparate über eine Bildverstärkerkamera betrachtet und digital abgelichtet (Abb. 17-Abb. 20).^[307]

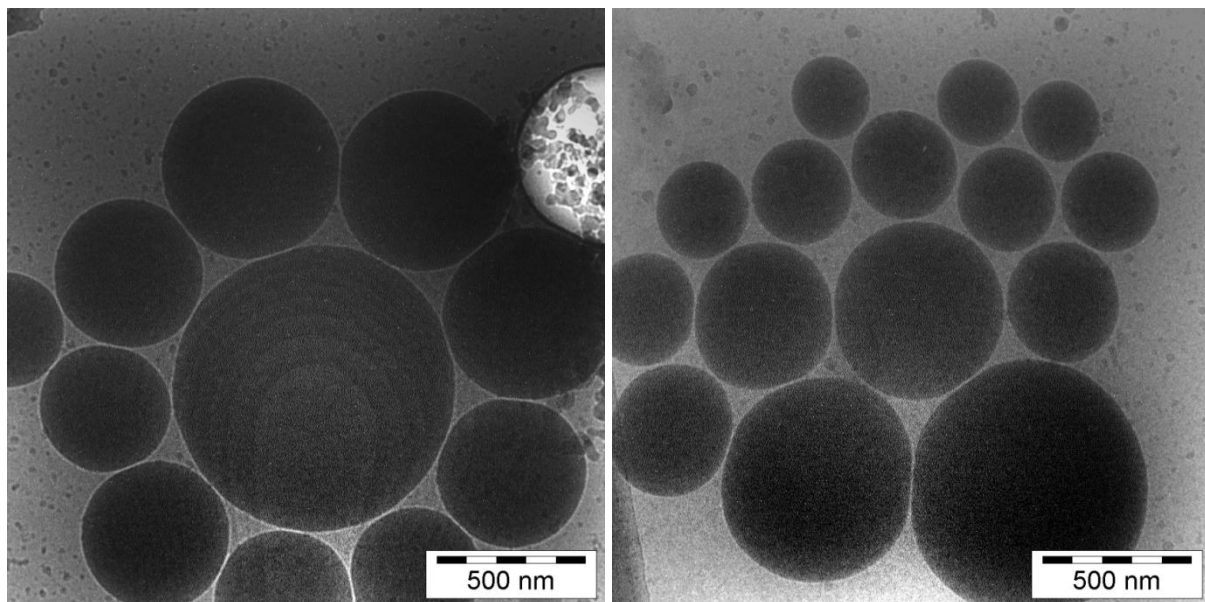


Abb. 17: Cryo-TEM-Aufnahmen von einem Standardansatz einer PnBCA-PFD-Nanokapseldispersion in 6.300-facher Vergrößerung.^[307]

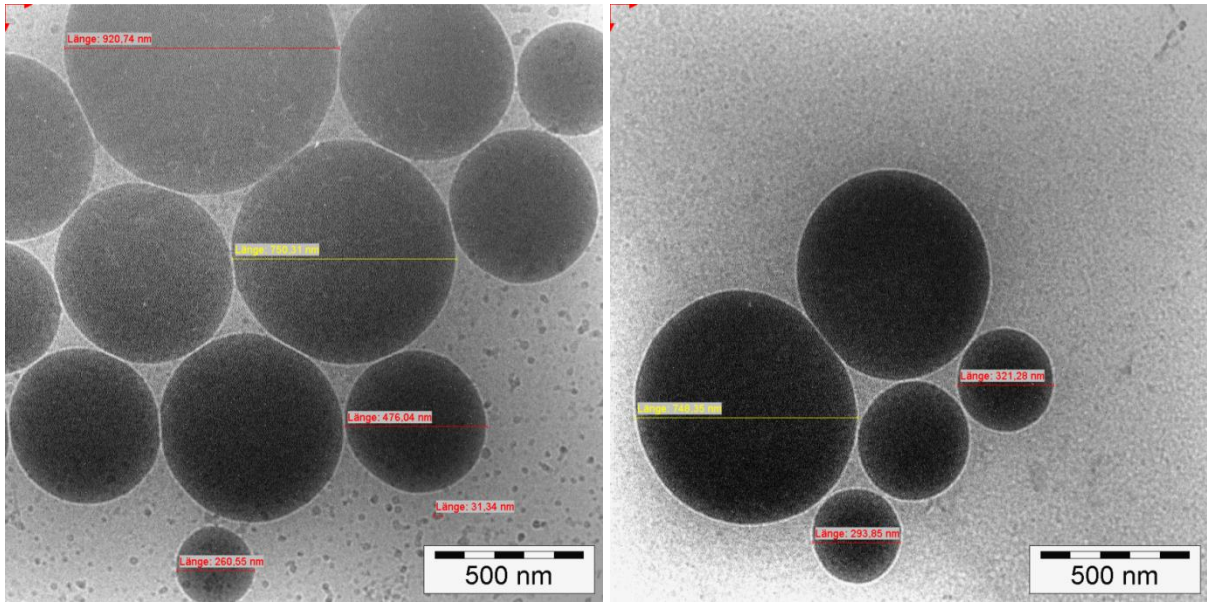


Abb. 18: Cryo-TEM-Aufnahmen mit Durchmesserangaben von einem Standardansatz einer PnBCA-PFD-Nanokapseldispersion in 6.300-facher Vergrößerung.^[307]

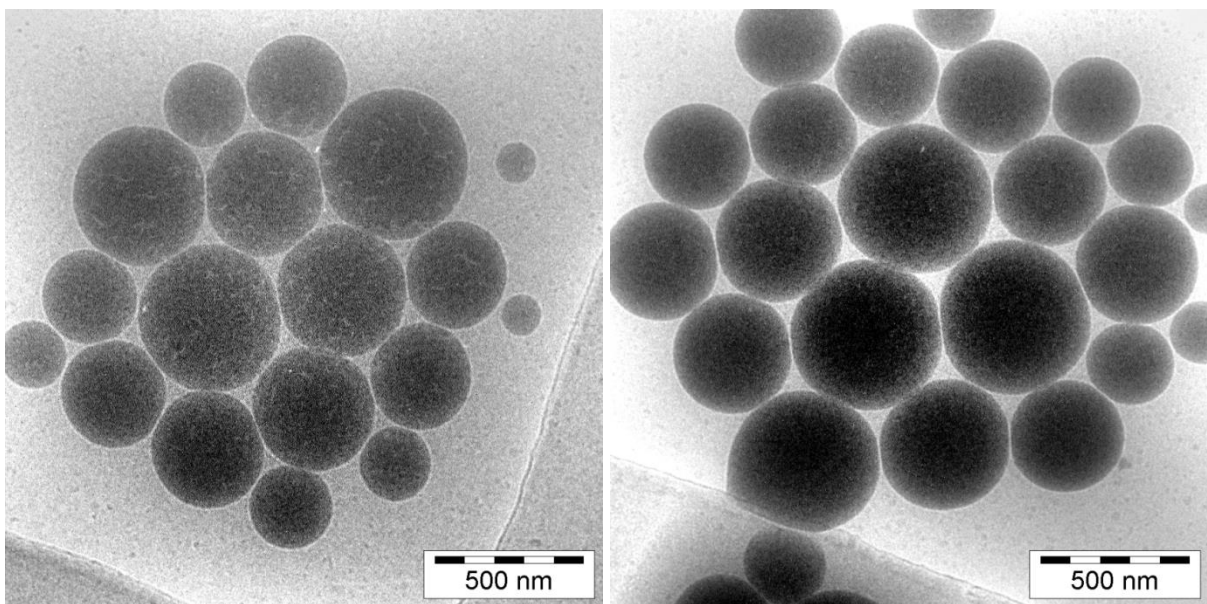


Abb. 19: Cryo-TEM-Aufnahmen von einem 40-fach hochskalierten Ansatz einer PnBCA-PFD-Nanokapseldispersion in 6.300-facher Vergrößerung.^[307]

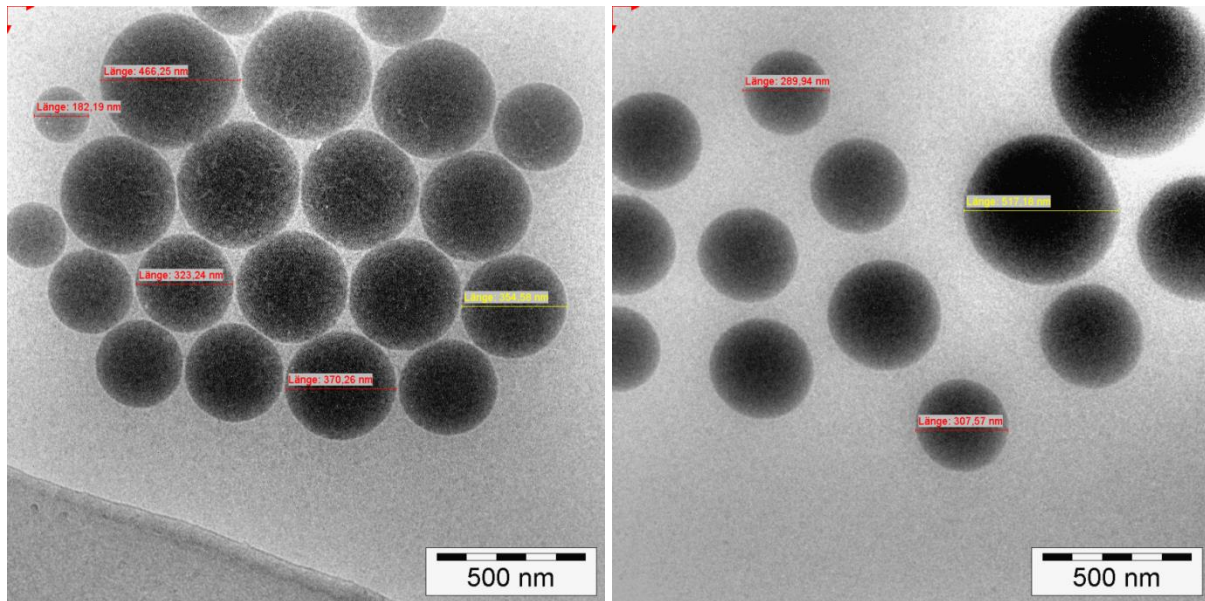


Abb. 20: Cryo-TEM-Aufnahmen mit Durchmesserangaben von einem 40-fach hochskalierten Ansatz einer PnBCA-PFD-Nanokapseldispersion in 6.300-facher Vergrößerung.^[307]

Die Bilder zeigen insgesamt eine qualitativ-hochwertigere Darstellung der Nanokapseln als die vorangestellten Techniken. Die daraus abzuleitenden Nanokapseldurchmesser liegen im Bereich von 180 und 920 nm. Dabei scheinen die Nanokapseln des Standardansatzes leicht polydisperser und größer als die Kapseln in der 40-fach hochskalierten Standardsynthese zu sein. Auch wenn dieser Zusammenhang anhand der zugrunde liegenden Partikelanzahl statistisch nicht valide begründet werden kann, so findet dies dennoch eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen des *Nanoparticle Tracking* (vgl. Kap. 5.3), das derartige Aussagen zulässt. Weiterhin lässt sich die Wandstärke der Kapseln mithilfe der Pixel bestimmen; sie liegt bei 9 ± 3 nm. Aus geometrischer Betrachtung der Höhe eines Monomers von etwa 11 \AA lässt sich daraus eine ungefähre Anzahl von etwa acht Polymerschichten ableiten, vorausgesetzt die dazu idealisierten Schichten grenzen unmittelbar aneinander an bzw. überlappen sich nicht. Die Fläche der eingesetzten Monomermenge würde in dieser Betrachtung jedoch nur für eine zwei- bis dreifache Bedeckung der Kapseloberflächen ausreichen, d.h. die Dicke der Kapselwände würde maximal 2-3 nm betragen. Diese Abweichung deutet darauf hin, dass die 2-dimensionale Bildgebung in der Cryo-TEM Artefakte aus der Dreidimensionalität der sphärischen Probenstruktur produziert, da auch Dichtebestandteile der Hülle außerhalb des „Kapseläquators“ in der vom Elektronenstrahl abgerasterten Ebene zum „Querschnittsbild“ beitragen. Weniger wahrscheinlich ist hingegen die Möglichkeit, dass ein Teilvolumen des PFD nicht zur Kapselbildung beiträgt, z.B. an Gefäßwandungen verloren geht.

Die Cryo-Mikrotomie wäre zur Morphologieuntersuchung ebenfalls ein mögliches Verfahren. Dabei werden von einem Lyophilisat Dünnschnitte angefertigt, das in einer Epoxidharzmatrix eingebettet, bei niedriger Temperatur zu einem Block ausgehärtet und in Schnitte geeigneter Dicke segmentiert wird. Dabei könnten Aussagen zur inneren und umhüllenden Kapselerscheinung nebst Größe und insbesondere der Wandstärke getroffen werden. Jedoch wäre die Größenbestimmung *per se* fehlerbehaftet, da hierbei nicht gut zwischen Schnitten direkt im „Kapseläquator“ von denen unterschieden werden könnten, die näher an den „Kapselpolkappen“ lokalisiert sind. Ebenfalls könnten an den Wänden Artefakte durch das Schneiden entstehen.

4.2.3 UV/Vis/NIR-Spektrophotometrie

Wie bereits in Kap. 3.2 erwähnt, wurden die Kapselkerne mit Porphyrinderivaten^[267] angefärbt. Deren optische Eigenschaften wurden photometrisch bestimmt, um zukünftige medizinische Experimente planen zu können, z.B. hinsichtlich Filterauswahl.

Gemessen wurde in ULTRA Micro-Cell-Küvetten (Ocean Optics, Inc.) mit dem PerkinElmer LAMBDA 950 UV/Vis/NIR-Spektrophotometer, ausgestattet mit einem STD-Detektormodul. Dafür wurden die Farbstoffe jeweils sowohl in Aceton p.a. als auch in *cis*-, *trans*-Perfluordecalin gelöst und ihre Absorptionsspektren aufgenommen.

Nachstehend sind die Strukturformeln (Abb. 21, Abb. 24, Abb. 27) und die (UV-)Vis-Spektren (Abb. 22, Abb. 23, Abb. 25, Abb. 26, Abb. 28, Abb. 29) der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe gezeigt:

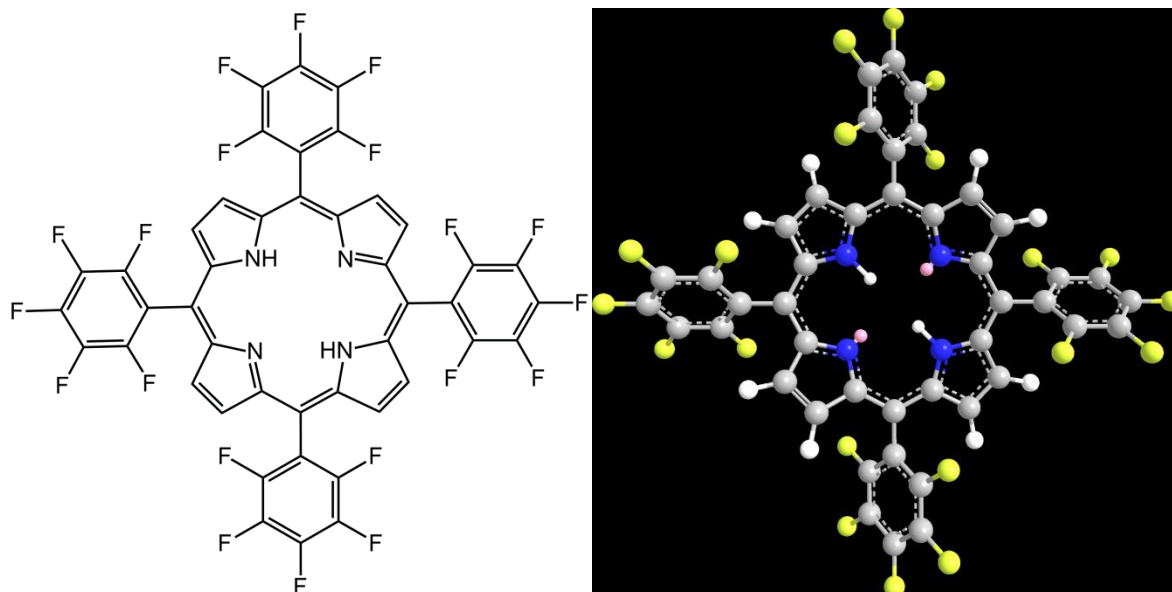


Abb. 21: Strichformel- und räumliche Darstellung des fluorierten Fluoreszenzfarbstoffes 5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-Porphyrin.

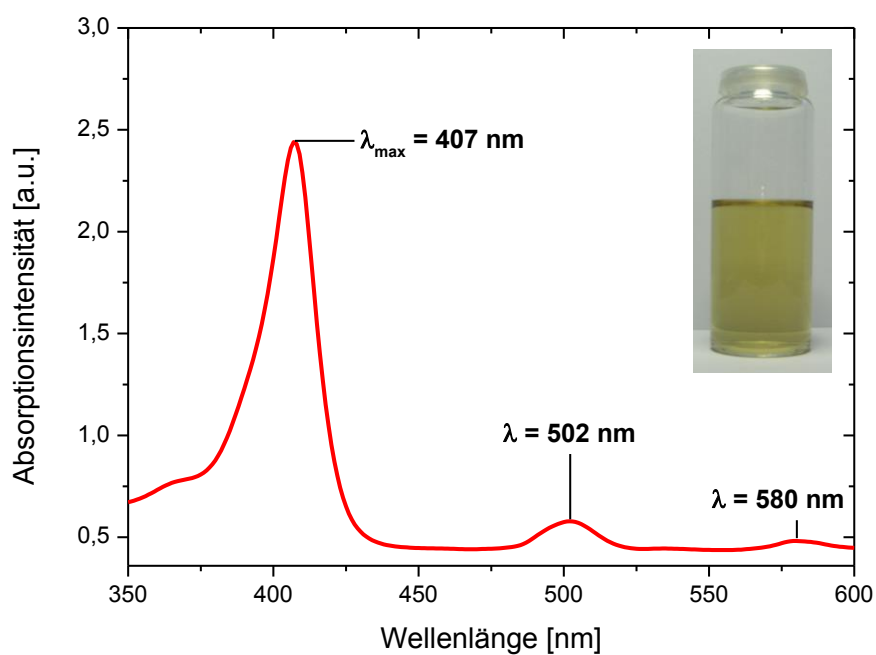


Abb. 22: Absorptionsmaxima des fluorierten Fluoreszenzfarbstoffes 5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-Porphyrin in Aceton p.a. (0,00045 g T in 20 mL Aceton p.a.).

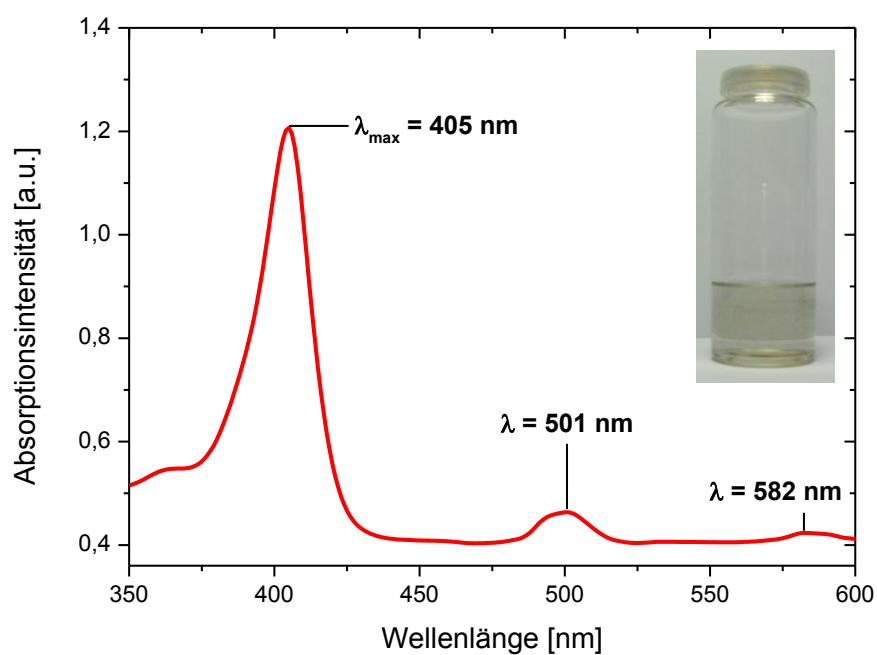


Abb. 23: Absorptionsmaxima des fluorierten Fluoreszenzfarbstoffes 5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-Porphyrin in *cis*-, *trans*-Perfluorodecalin (0,00040 g T in 10 mL PFD).

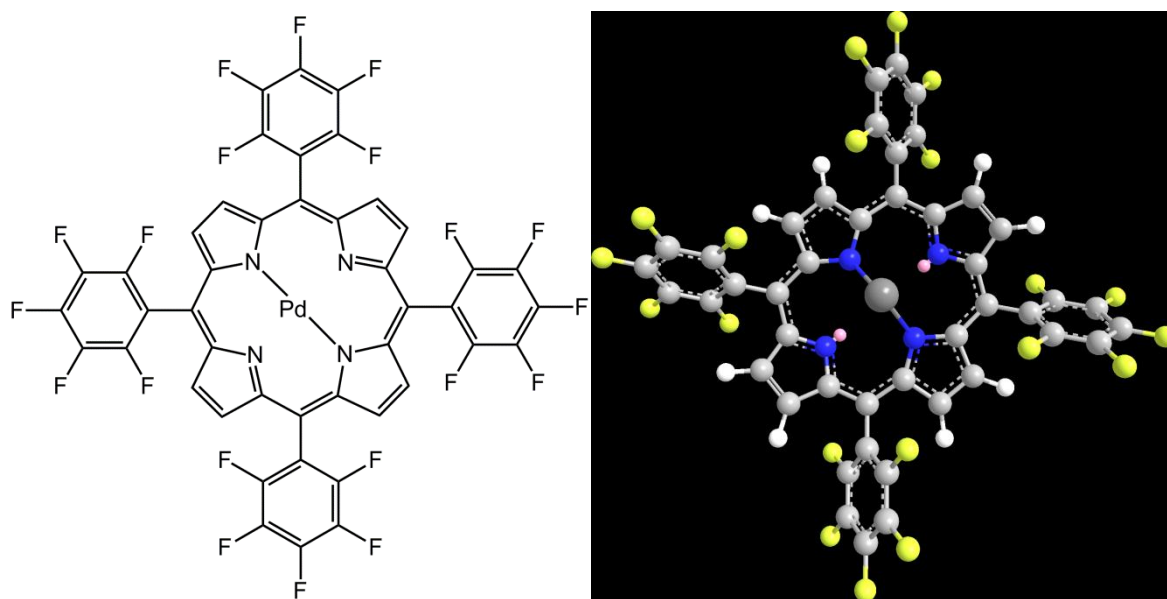


Abb. 24: Strichformel- und räumliche Darstellung des fluorierten Fluoreszenzfarbstoffes 5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-21*H*, 23*H*-Porphin-Palladium(II).

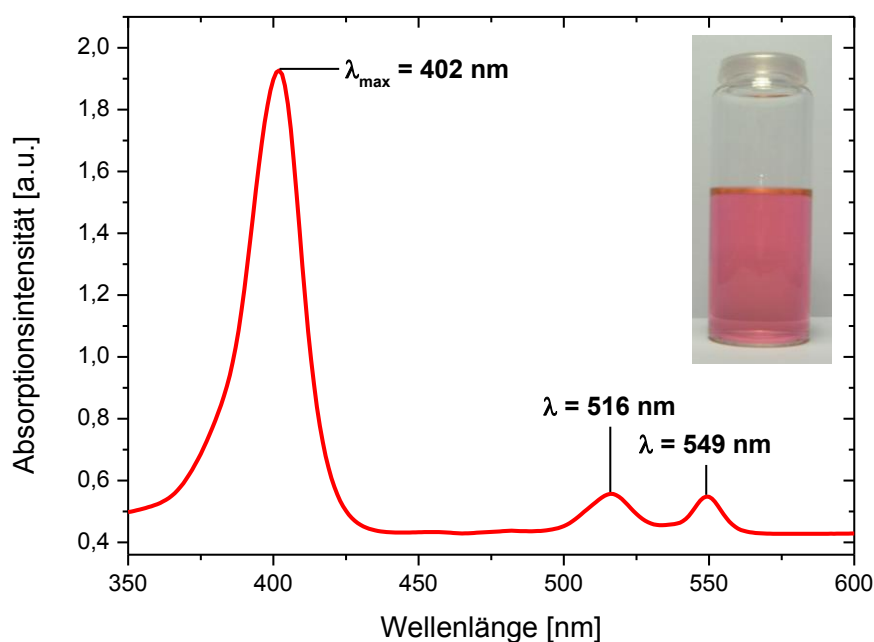


Abb. 25: Absorptionsmaxima des fluorierten Fluoreszenzfarbstoffes 5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-21*H*, 23*H*-Porphin-Palladium(II) in Aceton p.a. (0,00048 g PdT in 20 mL Aceton p.a.).

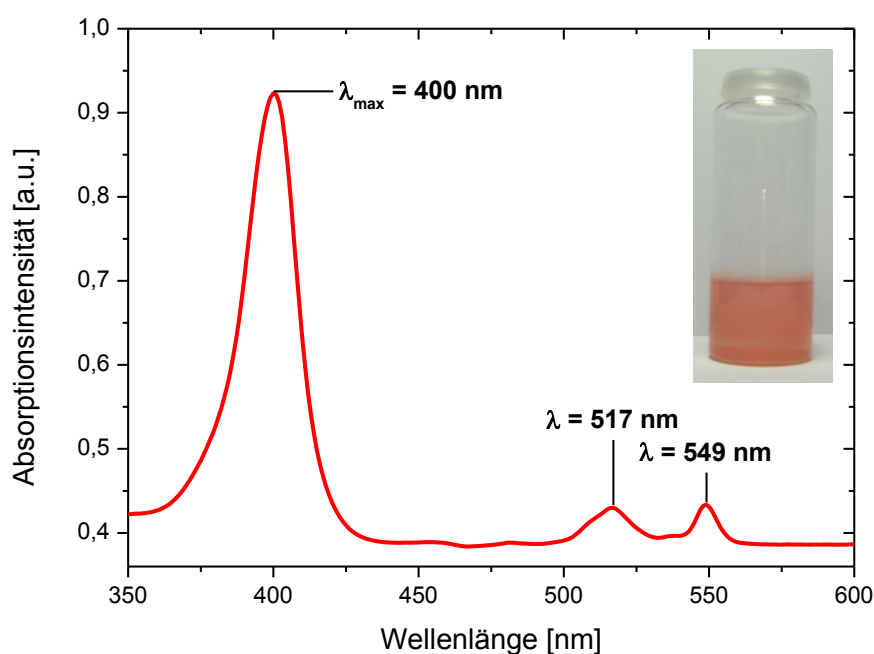


Abb. 26: Absorptionsmaxima des fluorierten Fluoreszenzfarbstoffes 5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-21*H*, 23*H*-Porphin-Palladium(II) in *cis*-, *trans*-Perfluordecalin (0,00043 g PdT in 10 mL PFD).

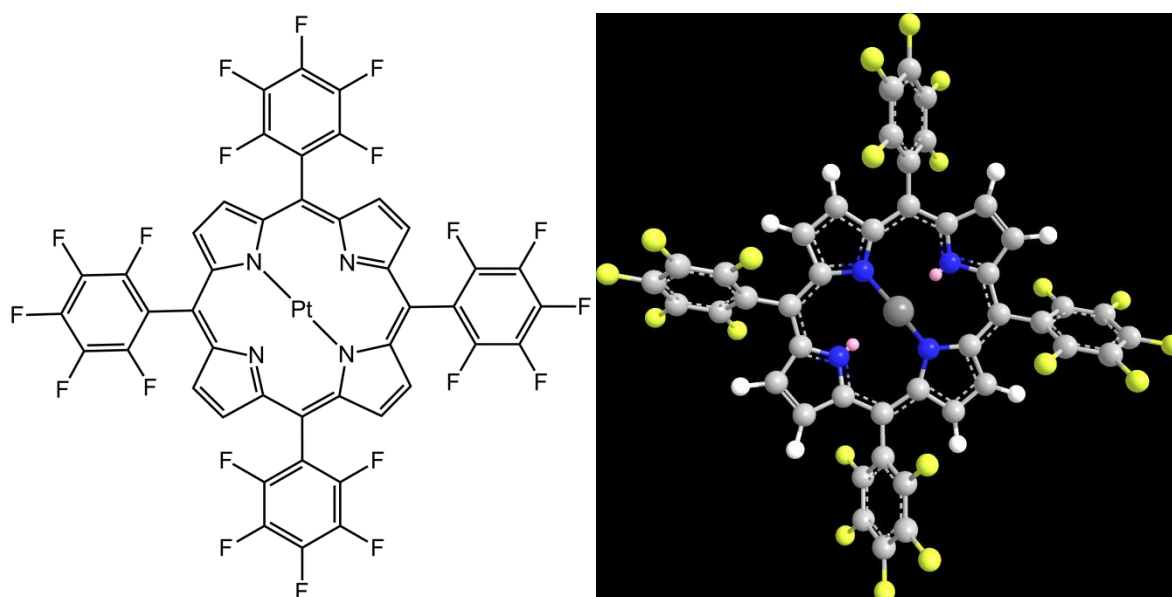


Abb. 27: Strichformel- und räumliche Darstellung des fluorierten Fluoreszenzfarbstoffes 5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-21*H*, 23*H*-Porphin-Platin(II).

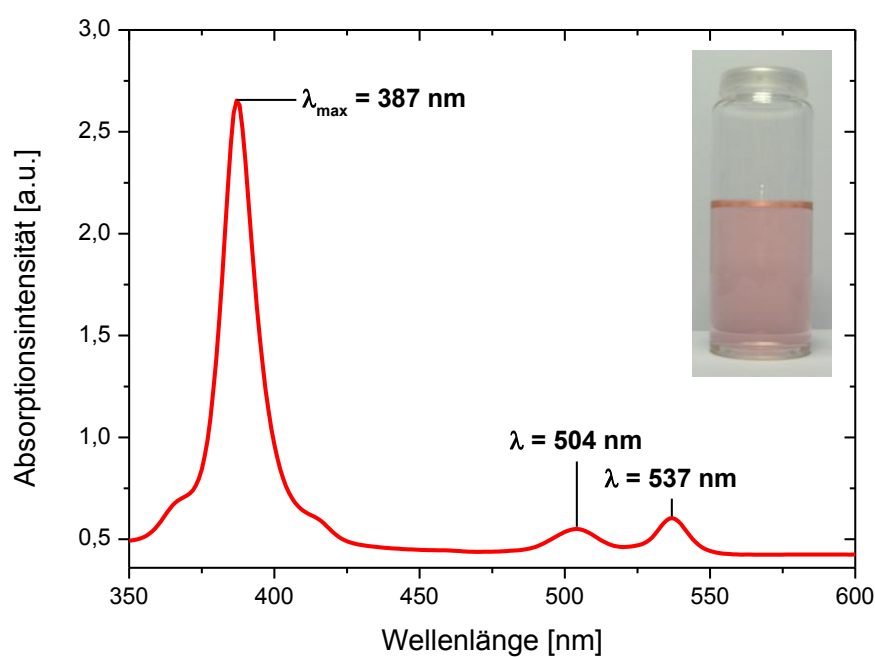


Abb. 28: Absorptionsmaxima des fluorierten Fluoreszenzfarbstoffes 5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-21*H*, 23*H*-Porphin-Platin(II) in Aceton p.a. (0,00040 g PtT in 20 mL Aceton p.a.).

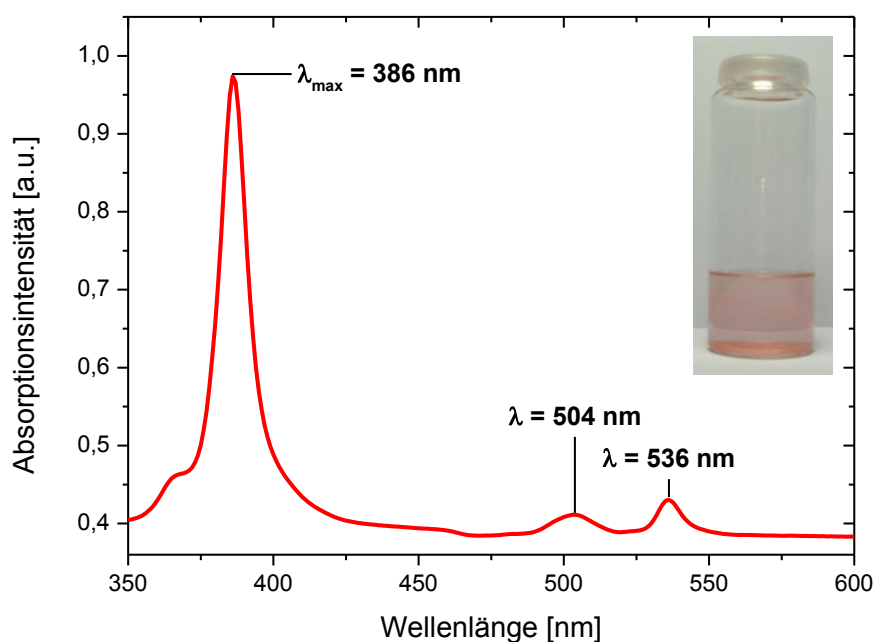


Abb. 29: Absorptionsmaxima des fluorierten Fluoreszenzfarbstoffes 5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-21*H*, 23*H*-Porphin-Platin(II) in *cis*-, *trans*-Perfluordecalin (0,00038 g PtT in 10 mL PFD).

Ebenfalls und mit analoger Vorgehensweise wurde 5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-21*H*, 23*H*-Porphyrin-Eisen(III)chlorid in Aceton und in PFD photometrisch charakterisiert. Die Maxima in Aceton lagen bei 408 nm (Hauptmaximum) und 562 nm (0,00039 g FeT in 20 mL Aceton). Die Maxima in PFD betrugen 411 nm (Hauptmaximum), 493 nm und 557 nm (0,00035 g FeT in 10 mL PFD). Beide Lösungsmittel können zwar anhand dieses Farbstoffes gut angefärbt werden (in Aceton eisenbrauner und in PFD beige bis oliv-/schlammgrüner Farbumschlag), jedoch lieferten die SR-SIM-Aufnahmen keine repräsentativen Aufnahmen, deshalb sind die (UV-)Vis-Spektren hier auch nicht gezeigt.

Insgesamt wird eine hypsochrome Verschiebung der Hauptmaxima von T über FeT und PdT zum PtT beobachtet. Dieser Trend liegt in guter Übereinstimmung mit der spektrochemischen Reihe^[308]. Das Ausmaß der ursprünglichen Energieaufspaltung des Porphyrins T wird durch die Metallionen entsprechend dieser Sequenz ($\text{Fe}^{3+} < \text{Pd}^{4+} < \text{Pt}^{4+}$), in einem hierbei angenommenen oktaedrischen Ligandenfeld (axiale Ligandenplätze können durch O_2 oder Aceton okkupiert werden), durch die Stabilisierungsenergie erhöht. Dadurch verringert sich die Wellenlänge, also wird auch der Energieunterschied zwischen den beiden Zuständen der sichtbaren Anregung erhöht.

Interessanterweise können Palladium- und Platin-Porphyrine aufgrund ihrer starken Phosphoreszenz bei Raumtemperatur, hoher Ausbeuten und kurzer Lebensdauer im Triplettstadium vielfältige Anwendungsmöglichkeiten als Sauerstoffsensoren entfalten^[309]. Sie wurden, u.a. bereits als bildgebende Sauerstoffsonden, zur Untersuchung der Sauerstoffverteilung in Gewebe eingesetzt^[309-312]. Die Fernsondierung kann zur Bestimmung der arteriellen Blutgase unter Verwendung von Glasfaserleitern erfolgen^[309,313,314]. Vielleicht ist in den zukünftigen medizinischen Experimenten auch eine Sauerstoffsättigung mithilfe der angefärbten Kapselsysteme messbar.

Routinemäßig sollen im AK H. de Groot, unter der Voraussetzung der Verwendung des dort präsenten LSM 510 (*Laser Scanning Microscope*) mit den Absorptionsmaxima von 458 nm, 488 nm und 514 nm (Argon-Laser) und 543 nm (He-Ne-Laser), geeignete fluoriierte Fluoreszenzfarbstoffe gefunden werden. Eine Detektion und möglicherweise eine Quantifizierung von PFD-gefüllten Nanokapseln sollen unter Zuhilfenahme des LSM anhand der Intravitalmikroskopie und histologischer Untersuchungen durchgeführt werden. In Gewebeschnitten könnten Einzelkapseln, Kapselagglomerationen, -akkumulationen und -phagozytosen nachgewiesen und lokalisiert werden. Um einen Farbstoff für die dort stattfindenden Versuche zu finden, muss der Farbstoff ein den technischen Möglichkeiten des LSM entsprechendes Absorptionsmaximum aufweisen. Da der für das Hauptmaximum verantwortliche Übergang bei den verwendeten Porphyrin-Derivaten offenbar mit der spektrochemischen Reihe korreliert, müssen vermutlich neue hochfluorierte Farbstoffsysteme gefunden werden, sofern keine ausreichende Sensitivität mit den Nebenmaxima gegeben ist. Bei der Wahl eines anderen Farbstoffes sollten selbstverständlich auch weitere Kriterien beachtet werden, wie z.B. hohe Absorptivität, gute Verfügbarkeit und geringe Toxizität.

4.2.4 SR-SIM

Ernst Abbe^[301] formulierte 1873 ein Gesetz, das die beugungsbegrenzte Auflösung und somit die Abbildungsgrenze von Probenstrukturen beschreibt und welches heute noch gültig ist^[315]. Die klassische optische Auflösungsgrenze eines optischen Weitfeldlichtmikroskops ist durch die Beugung fundamental begrenzt^[316,317], da nicht beliebig kleine Lichtwellenlängen verwendet werden können. Durch Modifizierung von Mikroskopen und deren Abbildungsmöglichkeiten können Auflösungen über das Abbesche Gesetz hinaus realisiert werden^[317].

1963 wurden schon konzeptionell von *Lukosz und Marchand*^[318] die Grundlagen der strukturierten Beleuchtung entwickelt. Als Erste beschrieben *Heintzmann et al.*^[319,320] den Effekt der Nichtlinearität und *Gustafsson et al.*^[316,321-324] konnten eine isotrope dreidimensionale Auflösungsverdopplung in der Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie (WF) durch strukturierte Beleuchtung (SIM) erwirken, und somit die laterale und axiale Auflösungsgrenze verdoppeln. Die besten Auflösungsvermögen liegen bei $\sim 100 \text{ nm}$ ^[316,320,325] für laterale (XY) Aufnahmen mit strukturierter Beleuchtung (SIM), bei $\sim 230 \text{ nm}$ ^[320] für laterale (XY) und bei rund $\sim 1000 \text{ nm}$ ^[320] (Y) für axiale Weitfeldaufnahmen (WF). Prinzipiell wird bei der SIM-Technik die Probe mit mehreren phasenverschobenen sinusförmigen Mustern beleuchtet^[316]. Die Helligkeitsunterschiede der detektierten Bilder werden dann durch den Gebrauch von Fourier-Transformationen in Raumfrequenzen umgewandelt, deren Überlagerung mithilfe des Moiré-Effektes ausgenutzt wird, um die feineren Probenbestandteile in einem kombinierten Bild zu rekonstruieren^[316].

Hell et al.^[315,326-328] überwinden die beugungsbedingte Auflösungsgrenze durch die Entwicklung eines stimulierten Emissions-Abregungs-Mikroskops (*Stimulated Emission Depletion (STED) Fluorescence Microscopy*). Damit erschufen sie die derzeit größte dreidimensionale Auflösung und revolutionierten so die konventionelle Lichtmikroskopie^[315,326-328].

Die Fluoreszenzaufnahmen (Abb. 30-Abb. 32) wurden im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Martin Bastmeyer von Herrn Michael Bachmann unter Verwendung des Superauflösungsmikroskops ELYRA PS.1 von Carl Zeiss erstellt, welches photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie (*Photo Activated Localization Microscopy, PAL-M*) und supraauflösende Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung (*Superresolution Structured Illumination Microscopy, SR-SIM*) vereint.

Die strukturierte Hochauflösungsfluoreszenzmikroskopie (*SR-SIM*) wurde zur Aufnahme der fluoreszierenden Kapselkerne verwendet. Zur Probenpräparation wurden $25 \mu\text{L}$ der entsprechenden Nanokapseldispersion auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Tröpfchen eines Einbettmediums⁶ vermischt.^[329] Im Anschluss wurde die Probe mit einem Deckglas bedeckt. Die Präparate trockneten bei Raumtemperatur an einem dunklen Ort für ein bis drei Tage, bis die Mowiol®-Mischung vollständig auspolymerisiert war, bevor sie zum Mikroskopieren herangezogen wurden. Die Hochauflösungsmikroskopie wurde mit einem 63-

⁶ Die Mowiol®-Einbettmischung besteht aus den folgenden Bestandteilen und wurde wie folgt hergestellt: 50 g Mowiol® (Polyvinylalkohol Höchst), 200 mL phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, Pufferlösung mit physiologischem pH-Wert 7,4), 16 h Rühren, falls notwendig Erwärmung auf 40°C (nicht höher), Zugabe von 100 mL Glycerin, 16 h Rühren, Einstellung des pH-Wertes zwischen 8,0-8,5 mit 1 M NaOH, Zentrifugation 15 min lang bei 4.000 rpm, Aliquotierung in 15 mL-Falcons und Einfrieren bei -20°C , Thimerosal kann als Konservierungsmittel zugegeben werden, eine Spatelspitze von *n*-Propylgallat kann als Fluoreszenzstabilisator zugegeben werden.

fachen Objektiv Plan-Apochromat NA 1,40 Oil DIC, Fa. Zeiss, eines nichtseriellen ELYRA PS.1-Prototypen (Fa. Zeiss) im SIM-Modus durchgeführt.^[329] Generell ist der Prototyp vergleichbar mit dem kommerziell erhältlichen PS.1-Mikroskop. Für die 405 nm-Anregung wurde ein Emissionsdoppelbandpassfilter zwischen 420-545 nm (blaue Fluoreszenz) und 575-640 nm (rote Fluoreszenz) eingesetzt. Ein weiterer Bandpassfilter für grüne Fluoreszenz umfasste den Wellenlängenbereich von 500-550 nm, während ein Langpassfilter ab 650 nm transmittierte und für infrarote Fluoreszenz ausgelegt war. Zusätzlich gab es als Schutz einen Sperrfilter ab 730 nm vor der Kamera. Der Anregungslaser besaß eine Wellenlänge von 405 nm. Die Detektion wurde mit einer EMCCD-Kamera (Andor iXon 885) realisiert. Die besten Ergebnisse wurden bei Aufnahme von 25 Rohdatenbildern (fünf Rotationen und fünf Verschiebungen pro Gitternetzrotation) je Aufnahme und bei z-Stacks mit Schnittdicken von 125 nm erhalten. Die finalen Aufnahmen wurden mithilfe der ZEN-Software aus den Rohdaten errechnet. Die Berechnungsparameter wurden so gewählt, dass sie zur besten Auflösung ohne Verursachung von Artefakten führten.^[329]

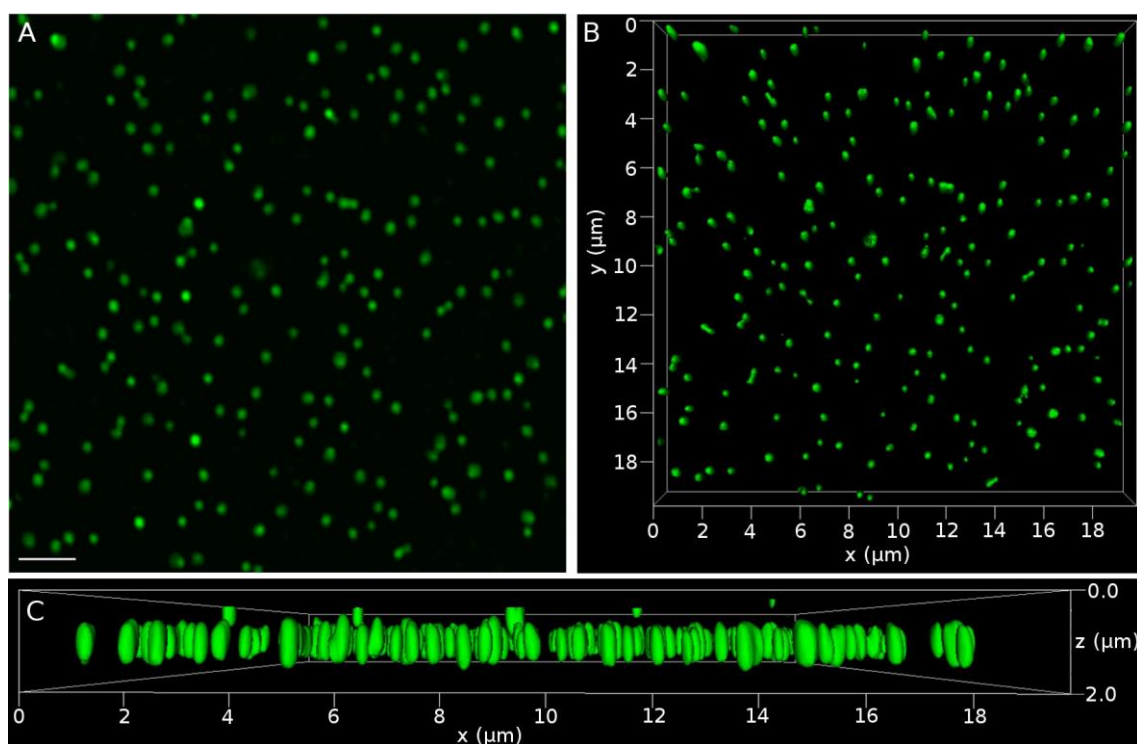


Abb. 30: SIM-Aufnahme (Maßstabsbalken 2 μm) der angefärbten *PnBCA*-PFD-Nanokapseln mit 5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-Porphyrin, A = Ebene des 3D-Stacks, normale 2D-Ansicht der Draufsicht, B und C = Oberflächenrenderings des 3D-Stacks (B = Draufsicht, C = Seitenansicht).^[329]

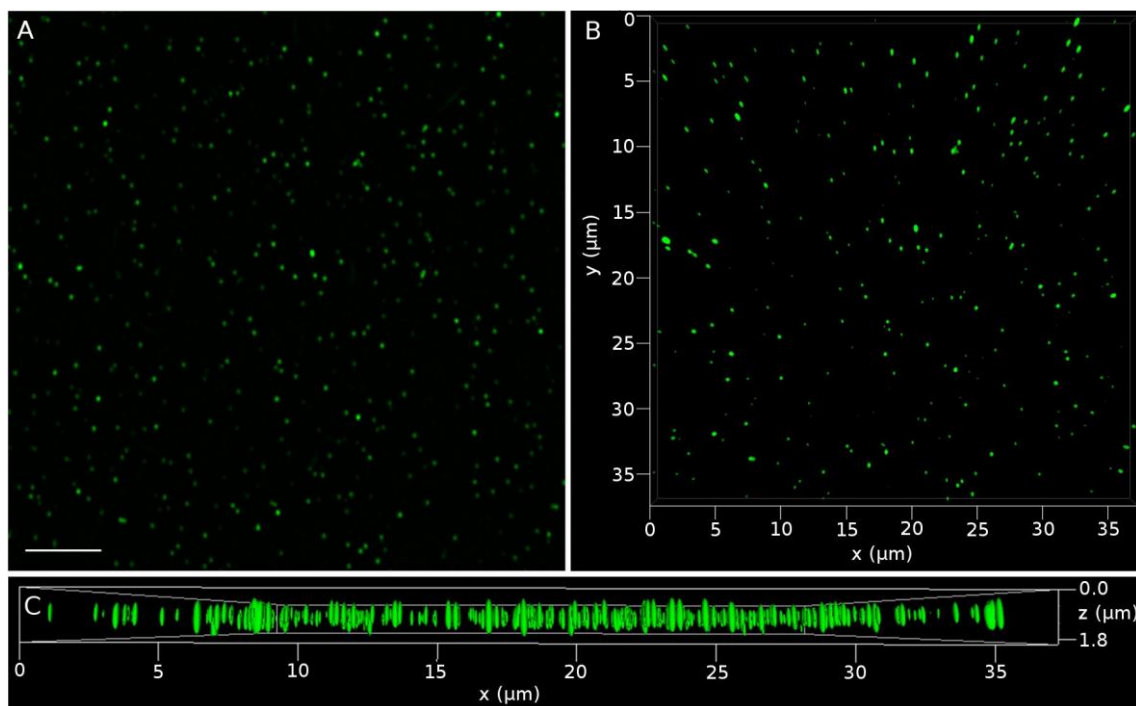


Abb. 31: SIM-Aufnahme (Maßstabsbalken 5 µm) der angefärbten *Pn*BCA-PFD-Nanokapseln mit 5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-21*H*, 23*H*-Porphin-Palladium(II), A = Ebene des 3D-Stacks, normale 2D-Ansicht der Draufsicht, B und C = Oberflächenrenderings des 3D-Stacks (B = Draufsicht, C = Seitenansicht).^[329]

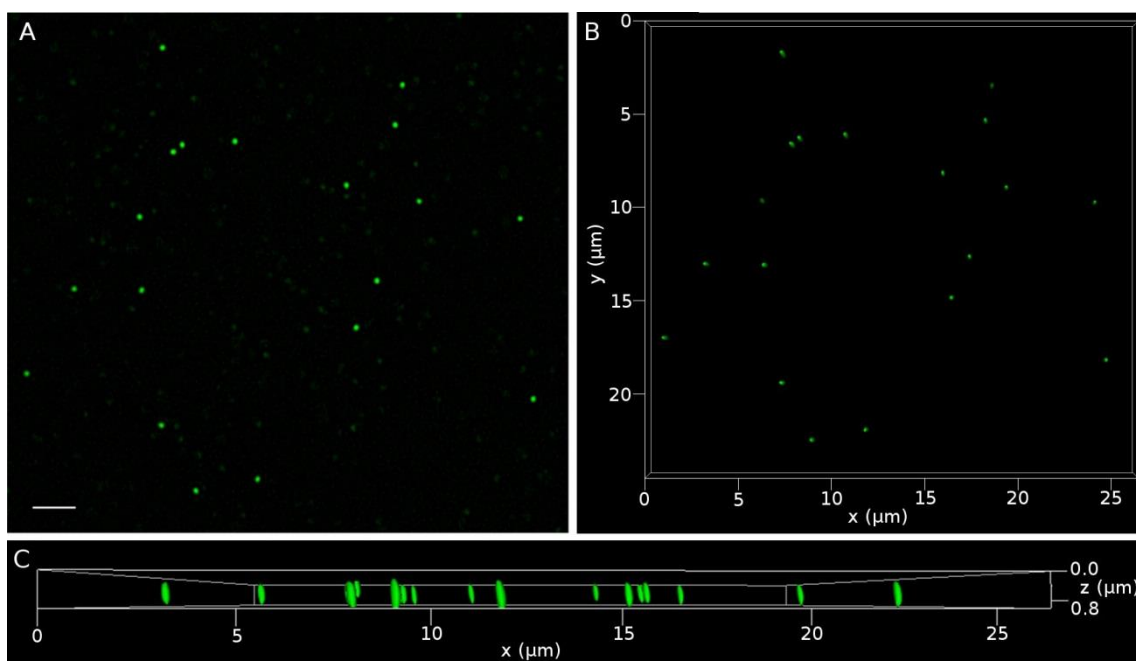


Abb. 32: SIM-Aufnahme (Maßstabsbalken 2 µm) der angefärbten *Pn*BCA-PFD-Nanokapseln mit 5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-21*H*, 23*H*-Porphin-Platin(II), A = Ebene des 3D-Stacks, normale 2D-Ansicht der Draufsicht, B und C = Oberflächenrenderings des 3D-Stacks (B = Draufsicht, C = Seitenansicht).^[329]

Die 3D-Ansichten zeigen, dass die grün dargestellten, gefärbten Kapseln prolat-sphäroidal anstatt sphärisch erscheinen. Diese täuschende Beobachtung resultiert aus der Punkt-Spreiz-Funktion des Mikroskopieverfahrens bzw. aus der schlechteren axialen Auflösung im Vergleich zur lateralen. Die Radien, die von allen Mikroskopen erhalten wurden, sind in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen vom *Nanoparticle Tracking*. Dies stellt gleichwohl sicher, dass die Anwesenheit des Fluoreszenzfarbstoffes während der Synthese das Ergebnis nicht erkennbar beeinflusst.

In Abb. 33 ist ein Auflösungsvergleich zwischen der Weitfeldmikroskopie (WF-Mikroskopie) (A), der *Structured Illumination Microscopy* (SIM) (B) und einer Überlagerung aus beiden mikroskopischen Verfahren (C) anhand des Farbstoffes 5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-21*H*, 23*H*-Porphin-Platin(II) aufgeführt.^[329]

Mittels dieses Vergleiches wird deutlich, dass SIM ein deutlich besseres Auflösungsvermögen als WF-Mikroskopie besitzt. Eine Überlagerung beider Verfahren zeigt dies deutlich:

In Abb. 33 (C) ist im Zentrum der Kapseln gelb als Überlagerung aus der roten WF-Aufnahme und der grünen SIM-Aufnahme zu sehen. Darüber hinaus zeigen die Kapseln in der Überlagerung aber einen roten „Kranz“, verursacht durch die schlechtere Auflösung der WF-Mikroskopie.^[329]

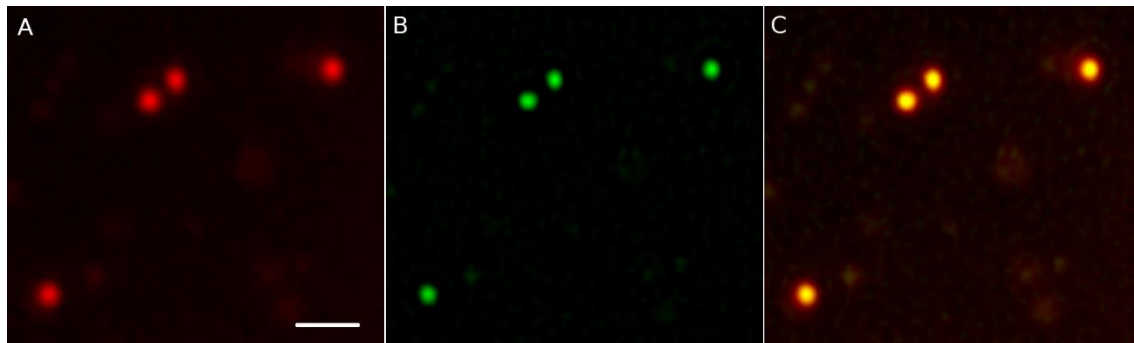


Abb. 33: Auflösungsvergleich (Maßstabsbalken 1 μm) anhand einer 2D-Ebene angefärbter PnBCA-PFD-Nanokapseln mit 5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-21*H*, 23*H*-Porphin-Platin(II): Abbildung (A) visualisiert eine Weitfeld-Fluoreszenzaufnahme, in Abbildung (B) ist der gleiche Ausschnitt als SIM-Aufnahme abgebildet und in (C) ist die Überlagerung von (A) und (B) wiedergegeben, wobei (A) rot und (B) grün dargestellt sind.^[329]

4.2.5 ^{19}F -NMR-Spektroskopie und Spektrum des Bulk-PFD

Eine leistungsfähige Methode, um die Präsenz von Nanokapseln in Partikeldispersionen in diesem Falle zu überprüfen, ist die ^{19}F -NMR-Spektroskopie. Die Anwesenheit des PFD in der Probe wird dadurch nachgewiesen, dass die spezifischen Signale der Fluoratome detektiert werden. Dieses Signal wird von der Spinkopplung mit den Nachbaratomen beeinflusst, was ein Multiplett hervorbringt (Abb. 34 und Abb. 47). Aus den erhaltenen Signalintensitäten kann der PFD-Gehalt innerhalb des Probenvolumens bestimmt werden. Außerdem kann der gemessene Fluorgehalt dadurch fast ausschließlich den Nanokapseln zugeordnet werden, aufgrund der ziemlich schlechten Wasserlöslichkeit des PFD und den zuvor erbrachten Belegen, dass das PFD eingekapselt wird.

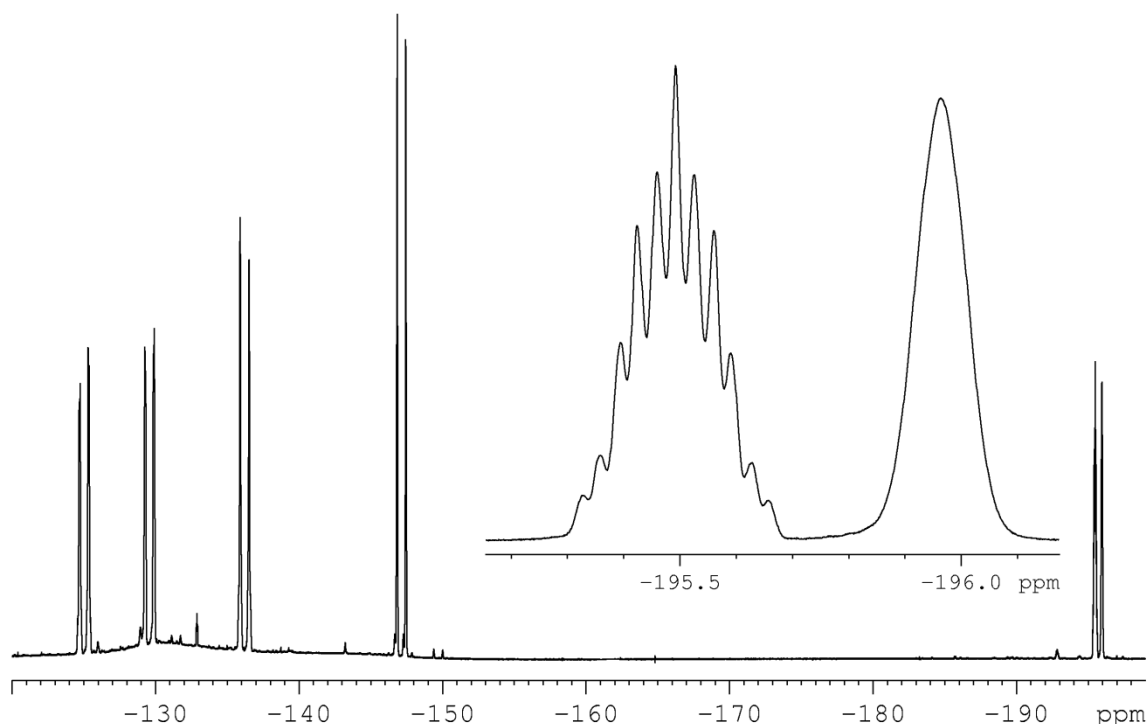


Abb. 34: ^{19}F -NMR-Spektrum des uneingekapselten *cis*-, *trans*-Perfluordecals (*Bulk-PFD*)

In Abb. 34 ist das ^{19}F -NMR-Spektrum des uneingekapselten *cis*-, *trans*-Perfluordecals aufgeführt. Das Spektrum im Ausschnitt rechts oben zeigt die Resonanzlinien der zwei äquivalenten Fluoratome an den Positionen 9 und 10 des *cis*-, *trans*-Perfluordecals^[122]. Die beiden Signalgruppen bei -195,5 ppm und -196,0 ppm können einesteils dem *cis*- und anderenteils dem *trans*-Isomer des Perfluordecals zugeordnet werden^[122,330]. Diese beiden Signale sind Indikator für das *cis*-, *trans*-Perfluordecalin bei den ^{19}F -NMR-Messungen und

werden zur Detektion der Fluorsignale herangezogen. Dabei resultieren die unterschiedlichen Breiten der einzelnen F-Signale aus der charakteristisch unterschiedlichen Konformationsdynamik der beiden Isomere^[122]. Die Konformation des *cis*-Isomers (−195,5 ppm) befindet sich in einem schnellen Konformationsgleichgewicht, während das *trans*-Isomer (−196,0 ppm) sich sogar bei Raumtemperatur relativ unbeweglich verhält^[122,330].

4.3 Analyse gelöster Gase im *cis*-, *trans*-Perfluordecalin

Dass Perfluorcarbone (bzw. PFD) eine hohe Gaslöslichkeit für physiologisch-relevante Gase besitzen, ist gut bekannt^[37,40,73,80,125,131,135,331], (vgl. Kap. 2.2.3). Um die Ursache dafür näher zu beleuchten, wurden sowohl experimentelle als auch theoretische Ansätze gewählt. Beide Vorgehensweisen zielen u.a. darauf ab, ob die Art der Löslichkeit ausschließlich physikalischer Natur ist, wie es in der Literatur allgemein anerkannt ist^[37,40,73,80,125,131,135,331], oder ob es auch eine signifikante chemische Beteiligung gibt, die diese hohe Löslichkeit erklärt. Die hierbei verwendete Raman-Spektroskopie kann darüber hinaus dazu verwendet werden, um die Gaslöslichkeit zu quantifizieren.

4.3.1 Mikro-Raman-Spektroskopie

Die Mikro-Raman-Spektroskopie wurde in Zusammenarbeit mit S. Graß durchgeführt. Diese mikroskopische Variante der Raman-Spektroskopie wird in einem konventionellen Auflicht-Mikroskop betrieben, in dem ein Laser (hier die 488 nm-Linie eines Ar-Ionen-Lasers) im Strahlengang des Mikroskops eingekoppelt ist, um die Raman-Streuung der mikroskopierten Probe anzuregen, über ein Objektiv (hier 10-fach, Zeiss) zu sammeln und anschließend in einem Spektrometermodul zu analysieren. Im Unterschied zu den häufig eingesetzten „Küvetten-Geräten“, können hierbei verschiedene Positionen in den Proben spektroskopiert werden. Dadurch ist diese Technik auch nicht nur auf optisch transparente Proben limitiert. Ein weiterer Vorteil ist der, dass aufgrund der durch das Objektiv stark erhöhten Leistungsdichte der Anregungswellenlänge die spektralen Informationen fast ausschließlich aus dem konfokalen Fokusbereich stammen. Der zugrunde liegende und inhärent schwache Raman-Effekt an sich beruht auf der Frequenzänderung des

Anregungslichtes durch Schwingungsübergänge von Probenmolekülen und bietet damit Zugang zu Zusammensetzung und Struktur einer Probe.^[332]

Zur Untersuchung der Gaslöslichkeit wurde PFD in NMR-Glasröhrchen vorgelegt, mithilfe einer Kapillare mit verschiedenen Gas-Mischungen bzw. reinen Gasen (N_2 , O_2 oder CO_2) für mindestens 30 min gesättigt und durch schnelles Abschmelzen mit einem Bunsenbrenner versiegelt. Ebenfalls wurde auch eine Probe mit entgastem PFD hergestellt, die unter Vakuumbedingungen (ca. 0,1 mbar) abgeschmolzen wurde und als Referenz (0 %) diente. Die so bereitgestellten Proben wurden dann mit dem Raman-Mikroskop (Aufbau ist in Lit.^[14] beschrieben) untersucht, indem jeweils zum einen auf die Lösung, zum anderen auf ihren gasförmigen Überstand fokussiert wurde. Da die Dichte von Gasen sehr gering ist und die Gase daher nur sehr schwache Raman-Signale liefern, wurde mit hoher Laserleistung (ca. 20 mW) und über lange Zeit (15 Wiederholungen mit 100 s) integriert.

Nachfolgend sind in Abb. 35 die Spektren mit flüssigem PFD gezeigt, die mit den reinen Gasen bzw. in entgastem Zustand erhalten wurden:

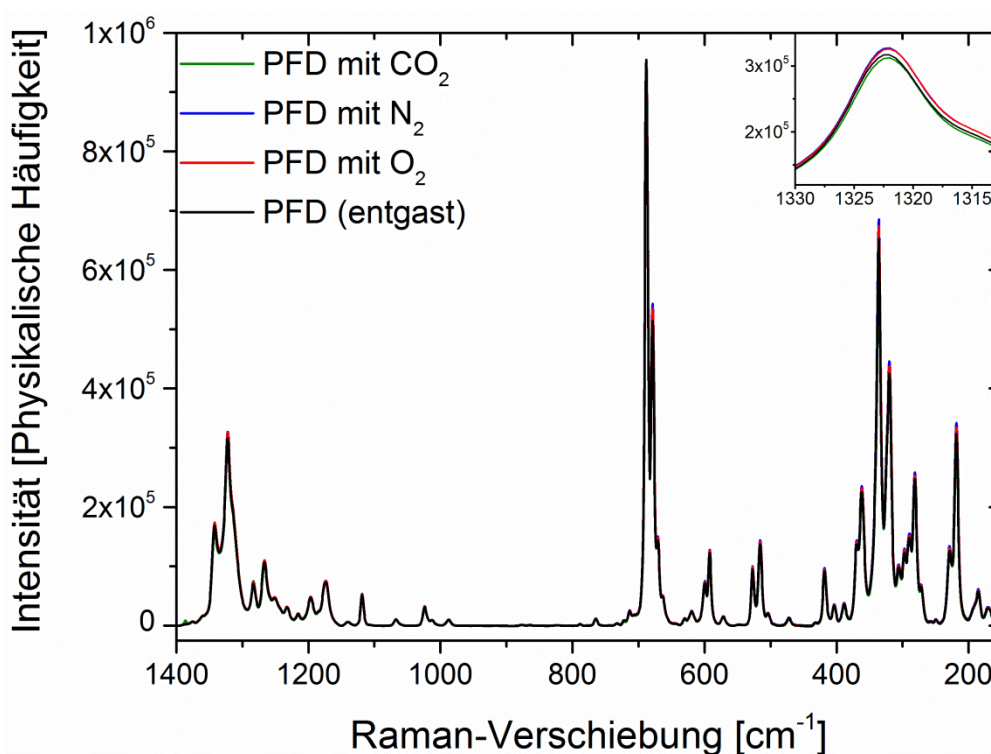


Abb. 35: Basislinienkorrigierte Raman-Spektren von entgastem PFD und PFD gesättigt mit Sauerstoff, Stickstoff und Kohlendioxid. Der Ausschnitt zeigt die intensitätsstärkste Bande im Bereich der CF-Schwingungen.

In der aktuellen Literatur konnte kein Vergleichsspektrum von Perfluordecalin aufgefunden werden, das eine exakte Bandenzuordnung zulässt. Eine genauere Zuordnung der Banden

wäre mithilfe der quantenchemischen Daten des nächsten Kapitels zwar möglich, jedoch sind diese Daten nicht hinreichend im Fokus dieser Arbeit verwendbar, daher wird folgend nur eine generelle Zuordnung gemacht. Im Bereich nahe der Rayleigh-Bande ($130\text{-}360\text{ cm}^{-1}$) befinden sich hauptsächlich die Torsionsmoden von $\text{R}_1\text{-CF}_2\text{-R}_2$ und Gerüstschwingungen^[333]. In den angrenzenden Bereichen folgen die Pendelschwingungen ($360\text{-}470\text{ cm}^{-1}$), die Kippschwingungen ($300\text{-}515\text{ cm}^{-1}$) und die Scherschwingungen ($375\text{-}720\text{ cm}^{-1}$) von $\text{R}_1\text{-CF}_2\text{-R}_2$ ^[333]. In diesen Regionen, sowie um $950\text{-}1055\text{ cm}^{-1}$ und $1165\text{-}1305\text{ cm}^{-1}$, können ebenfalls CC-Moden beinhaltet sein^[333]. Im linken Teil des Spektrums, um etwa $1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ und $1100\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$, partizipieren hauptsächlich die Übergänge der symmetrischen und asymmetrischen CF-Valenzschwingungen^[333]. Es fällt auf, dass die Spektren fast vollständig übereinstimmen. Falls eine chemische Löslichkeit vorliegt, so sollte sich jedoch eine Wellenlängen-Verschiebung einer oder mehrerer Moden relativ zur Referenz zeigen, da die Stärke der assoziierten Bindungen durch die Gasbindung verändert wird. Exemplarisch ist ein Ausschnitt in Abb. 35 gezeigt, der keine Veränderung zeigt. Auch aus der näheren Betrachtung aller anderen Banden können keine Verschiebungen der Bandenpositionen geschlossen werden. Entweder der Effekt ist zu gering, da er sich z.B. über mehrere Bindungen im PFD delokalisiert, oder es liegt hauptsächlich eine physikalische Lösung vor, in der sich die Gasmoleküle in den Lücken zwischen den Solvenzmolekülen befinden. Eine kleine Verschiebung der Wellenlänge von etwa $3 \pm 1\text{ cm}^{-1}$ wird jedoch bei den Valenzschwingungen der eingesetzten Gase gefunden, wie in den nachfolgend gezeigten Bereichen der Spektren in Abb. 36 erkennbar ist:

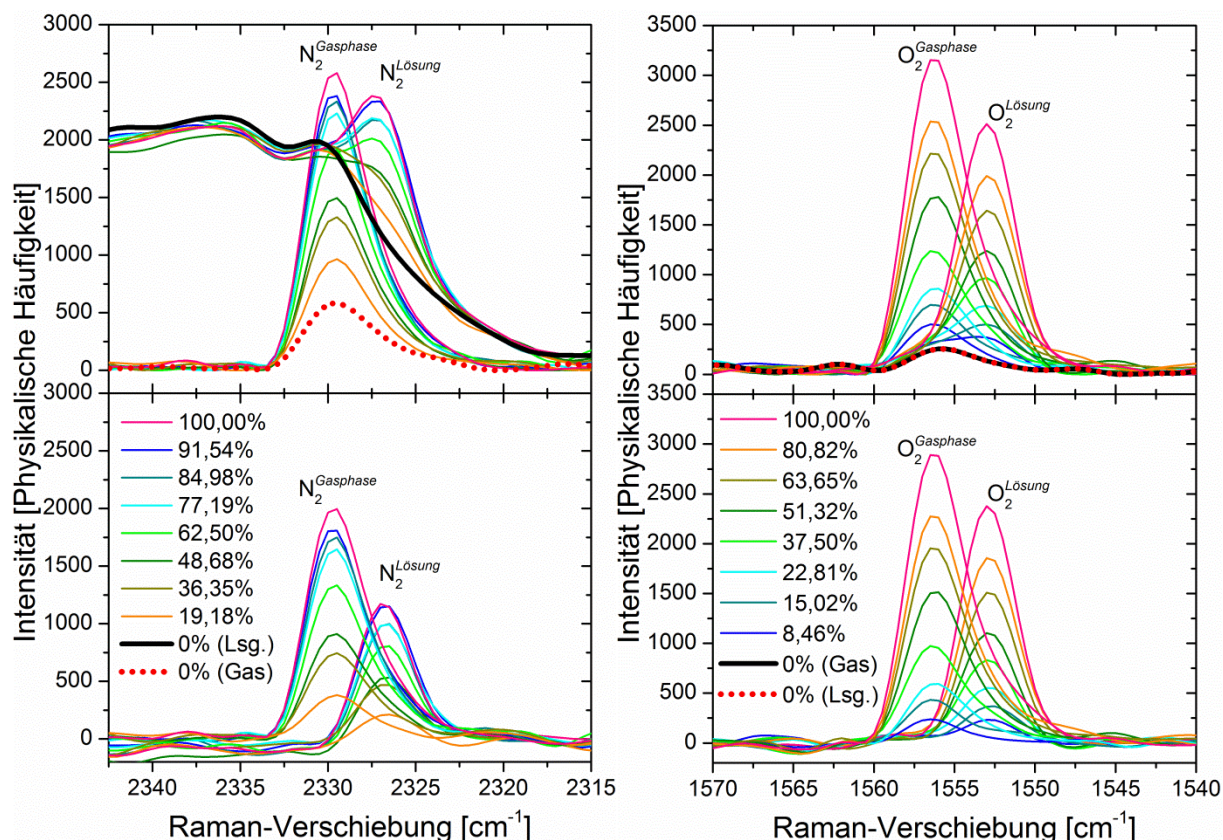


Abb. 36: Raman-Spektren von entgastem PFD und PFD gesättigt mit verschiedenen Stickstoff-Sauerstoff-Mischungsverhältnissen (in Vol.-%) im Bereich der N_2 -Valenzschwingung (links) und der O_2 -Streckschwingung (rechts). Die oberen Spektren sind basislinienkorrigiert und bezüglich der Laserleistung während der Einzelmessungen normiert. Die unteren Spektren repräsentieren jeweils die um die Referenzprobe (0 %) subtrahierten Varianten der oberen Spektren.

Dieser Nachweis der Verschiebung in den assoziierten Moden der gelösten Gase wirft die Frage auf, warum diese relative Verschiebung nicht auch in den Moden des PFD aufzufinden ist. Dies könnte ein weiterer Hinweis auf das Vorliegen einer physikalischen Solvation sein, da eine unspezifische, schwache und gleichzeitige Wechselwirkung der monovalenten homoatomaren Gasteilchen mit vielen Bindungen der relativ großen PFD-Moleküle nur einen geringen Effekt auf das PFD, aber einen größeren Effekt für das gelöste Molekül nach sich ziehen würde. Vielleicht werden aber auch alle Gasmoleküle beeinflusst, jedoch nur jedes hundertste PFD-Molekül. Einfach gesagt, konzentriert sich derselbe Effekt beim Gasteilchen auf eine einzelne Bindung, während er sich beim PFD über viele Bindungen verteilt. Der Effekt könnte sich beim PFD erst dann im gleichen Ausmaß zeigen, wenn die statistische Häufigkeit der PFD-Bindungen im System äquivalent zur Anzahl der O_2 -Bindungen ist, also theoretisch in einer Lösung von PFD in Sauerstoff, da die Löslichkeit von O_2 in PFD nicht

ausreicht um statistisch jede PFD-Bindung oder CF-Bindung mit einer O₂-Bindung zu besetzen (vgl. Tab. 2).

Die verschiedenen N₂/O₂-Gasgemische können auch hinsichtlich ihrer Signalintensitäten in den beiden fluiden Phasen analysiert werden, da diese intrinsisch das Verteilungsverhältnis enthalten. Dieser Ansatz wurde in der folgenden Auftrung (Abb. 37) realisiert, die sowohl die Intensitäten der O₂- und N₂-Streckschwingungen in beiden Phasen, als auch deren Verhältnisse, zusammenfasst:

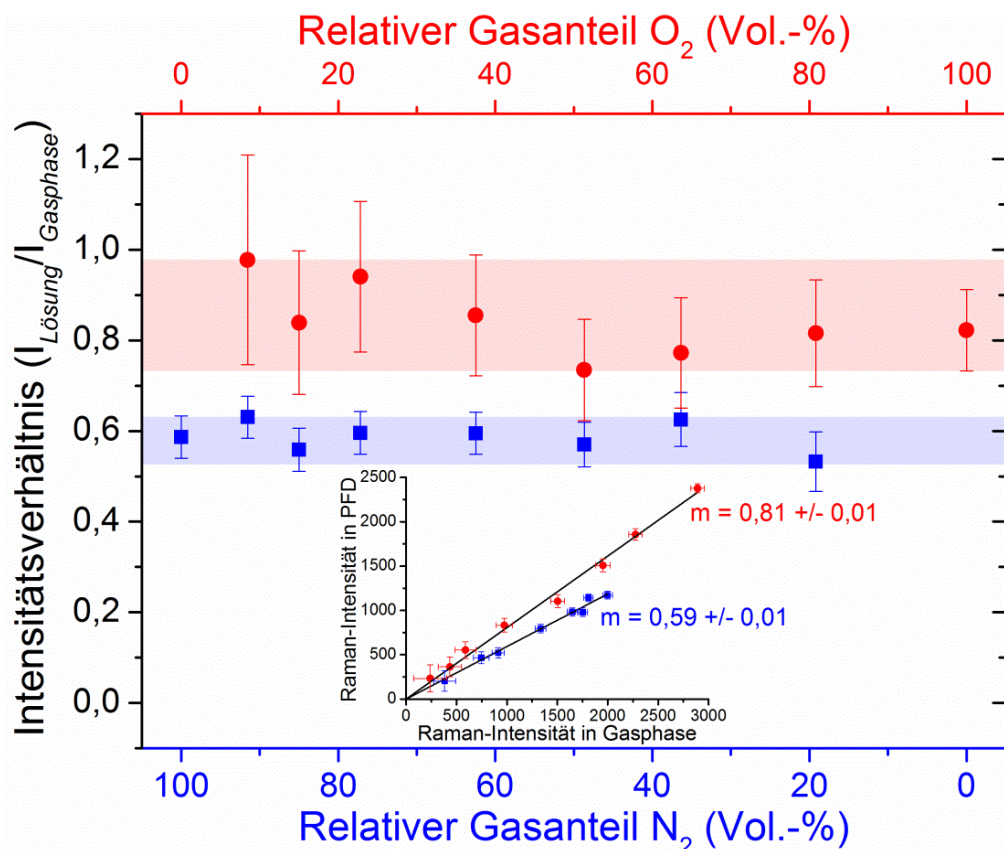


Abb. 37: Intensitätsverhältnisse der Gasanteil-abhängigen referenzkorrigierten Raman-Signale in flüssigem PFD und im Überstand. Eine Auftrung der assoziierten Signalintensitäten ist inkludiert und enthält eine lineare Anpassung, deren Steigungen und Standardfehler ebenfalls gezeigt sind ($R^2 > 0,99$). Die Fehlerbalken repräsentieren die relativen Rausch-zu-Signal-Verhältnisse (N/S), bestimmt mit der Methode des quadratischen Mittels (RMS) in dem zugrunde liegenden Wellenzahlbereich. Der Fehler des Intensitätsverhältnisses wurde in einer Fehlerfortpflanzung (nach Taylor^[334]) unter Verwendung der N/S-Werte kalkuliert.

Aus dem Verlauf der Intensitätsverhältnisse kann geschlossen werden, dass das Verteilungsverhältnis von Stickstoff zwischen dem PFD und der Gasphase nicht durch die koexistente Solvation von Sauerstoff beeinflusst wird. Der Umkehrschluss kann ebenfalls für Sauerstoff gezogen werden. Auch wenn die Werte im Bereich kleiner O₂-

Intensitätsverhältnisse stärker streuen (siehe Fehlerbalken), konnte kein signifikanter Trend in Kontrollexperimenten gefunden bzw. reproduziert werden. Das Streuen der Werte in diesem Bereich (etwa $< 25\%$ Gasgehalt) wird daher auf das Messen nahe oder unter der Sensitivitätsgrenze zurückgeführt, deren Erreichen durch die größeren Fehlerbalken (enthalten Rausch-zu-Signal-Verhältnisse) dokumentiert wird.

Insgesamt kann aus der beobachteten Unabhängigkeit des Intensitätsverhältnisses vom relativen Gasanteil interpretiert werden, dass die innere Struktur der Lösung weitgehend unbeeinflusst bleibt, auch in Hinsicht auf die Lösbarkeit der anderen Komponente. Dieses ideale Verhalten ist gleichfalls ein weiterer Hinweis auf die physikalische Natur der Solvation in diesem System. Außerdem sind diese Daten bei der Interpretation von vergangenen oder zukünftigen NMR-Gassättigungsexperimenten von Bedeutung, da diese Information aus NMR-Spektren nicht zugänglich ist.

Das vorliegende Intensitätsverhältnis des zwischen den beiden Phasen verteilten CO_2 ist aus dem spektralen Bereich einer der beiden Fermi-Resonanz-Banden (anharmonische Kopplung zwischen der symmetrischen Valenzschwingung ν_1 und dem ersten Oberton der Biegeschwingung $2\nu_2$)^[335-338] ebenfalls zugänglich, wie nachstehend in Abb. 38 gezeigt ist:

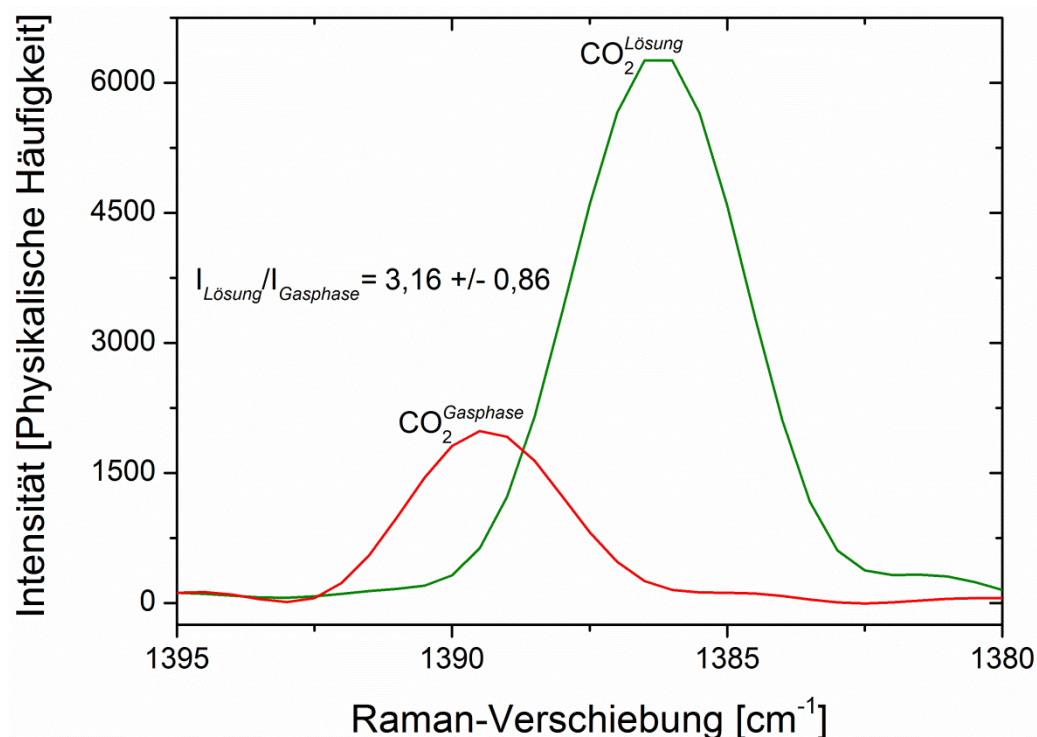


Abb. 38: Referenzkorrigierte Raman-Signale von Kohlendioxid in flüssigem PFD und im Überstand bei 100 %-iger Sättigung mit CO_2 . Das daraus bestimmte Intensitätsverhältnis und sein Fehler (Fehlerfortpflanzung) sind ebenfalls angegeben.

Um die gesammelten Daten bzw. Intensitätsverhältnisse weiter zu analysieren, ist es nützlich das Henry'sche Gesetz einzuführen, das die Proportionalität des Dampfdrucks p_i einer gelösten Komponente i zu seinem Molenbruch in der Lösungsphase x_i beschreibt, wobei k_H (oder K_H) eine Proportionalitätskonstante nach Henry darstellt:

$$p_i = x_i \cdot k_H \quad (\text{Gl. 6})$$

$$c_i^{\text{Gasphase}} \cdot RT = x_i \cdot k_H \quad \text{mit} \quad p_i = \frac{n_i^{\text{Gasphase}} RT}{V} = c_i^{\text{Gasphase}} \cdot RT \quad (\text{Gl. 7})$$

$$c_i^{\text{Gasphase}} = c_i^{\text{Lösung}} \cdot K_H \quad \text{mit} \quad x_i = \frac{n_i^{\text{Lösung}}}{\sum_n n_i} \approx \frac{n_i^{\text{Lösung}}}{n_{\text{Lösungsmittel}}} = \frac{c_i^{\text{Lösung}}}{c_{\text{Lösungsmittel}}} \quad (\text{Gl. 8})$$

$$\text{und} \quad K_H = \frac{k_H}{c_{\text{Lösungsmittel}} \cdot RT}$$

$$\Rightarrow K_H = \frac{c_i^{\text{Gasphase}}}{c_i^{\text{Lösung}}} \quad (\text{Gl. 9})$$

Unter der Annahme, dass die Stoffmenge des gelösten Gases deutlich kleiner ist als die Stoffmenge des Lösungsmittels ($n_i^{\text{Lösung}} \ll n_{\text{Lösungsmittel}}$), ergibt sich demnach also eine Art Henry-Konstante aus dem Konzentrationsverhältnis zwischen dem Gas in seiner Gasphase und dem gelösten Gas im Lösungsmittel.

Sofern sich die differentiellen Raman-Streuquerschnitte $\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)$ beim Wechsel der Gasteilchen von der Gasphase in die kondensierte Phase des PFD nicht ändern, korrelieren die gemessenen Intensitätsverhältnisse mit den spezifischen Verteilungsverhältnissen, da die zugrunde liegende Relation^[337,339] (eine Variation des Lambert-Beer-Gesetzes^[213,214]) eine Proportionalität zwischen der Teilchenzahldichte N und gemessener Intensität I vorschreibt:

$$I \propto N \cdot I_0 \left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right) \quad (\text{Gl. 10})$$

$$\Rightarrow \frac{I_{\text{Lösung}}}{I_{\text{Gasphase}}} = \frac{N_{\text{Lösung}} \cdot I_0 \left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)}{N_{\text{Gasphase}} \cdot I_0 \left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)} \approx \frac{N_{\text{Lösung}}}{N_{\text{Gasphase}}} \quad (\text{Gl. 11})$$

$$= \frac{n_{\text{Lösung}}}{n_{\text{Gasphase}}} = \frac{c_{\text{Lösung}}}{c_{\text{Gasphase}}}$$

Dieser Ausdruck ist identisch mit der inversen Henry-Konstante aus Gl. 9 bzw. einer Verteilungskonstante und kann nun dazu verwendet werden, um die bestimmten Intensitätsverhältnisse mit den Literaturwerten der Gaslöslichkeiten zu vergleichen.

Für O₂ beträgt die Löslichkeit 40 Vol.-% und für CO₂ 140 Vol.-% bei 25 °C^[37,125,135,340]. Dies bedeutet, dass sich in einem Liter einer gesättigten PFD-Lösung genauso viel O₂ bzw. CO₂ befindet, wie in 0,4 L bzw. 1,4 L reiner Gasatmosphäre unter Normaldruck. Nach Umrechnung in Konzentrationen, wobei die Dichte bei 25 °C eingeht (berechnet mit den interpolierten zweiten Virialkoeffizienten^[214]), ergibt sich:

Tab. 2: Maximale Konzentrationen und Teilchenzahlverhältnisse gelöster Teilchen bzw. Gase in PFD-Lösung bei 25 °C.

Substanz	Dichte (25 °C) [g/L]	c_{\max} [mol/L] in PFD-Lösung	$N_{\text{Gas}}/N_{\text{PFD}}$ in PFD-Lösung
O ₂	1,3094	$1,637 \cdot 10^{-2}$	1/253
CO ₂	1,8096	$5,757 \cdot 10^{-2}$	1/72
PFD	1917 ^[341]	4,149	-

Aus Tab. 2 folgt, dass auf ein Molekül O₂ etwa 250 Moleküle PFD kommen, während es beim CO₂ hingegen nur etwa 70 PFD-Moleküle sind.

Nun lassen sich die Tabellenwerte nicht genau auf die hier gegebene Situation übertragen, da sie bei 25 °C gesammelt wurden. Außerdem ist nicht klar, wie die Gasanteile in der aufgeführten Literatur^[37,125,135,340] bestimmt wurden. Dies könnte mit einem Manometer isochor geschehen sein, bei dem das gelöste Gas-Volumen aus der Druckänderung berechnet wurde, oder möglicherweise isobar per Volumenmessung. Daher kann nicht auf die verbleibende Gaskonzentration im Überstand geschlossen werden, die aber für den Vergleich mit den Raman-Daten benötigt wird. Für die spektroskopische Bestimmung wurde das Gleichgewicht jedoch isobar eingestellt. Dadurch besitzt die Gasphase in Näherung dieselbe Konzentration wie eine reine Gasphase (unter Vernachlässigung des verdampften Lösungsmittels). Daraus lassen sich die Gas-Konzentrationen in den PFD-Lösungen anhand von Gl. 11 mit den bestimmten Raman-Intensitätsverhältnissen berechnen:

Tab. 3: Maximale Konzentrationen und Teilchenzahlverhältnisse gelöster Teilchen bzw. Gase in PFD-Lösung bei 20 °C (aus Raman-Daten bestimmt).

Substanz	Dichte (20 °C) [g/L]	Intensitäts- verhältnisse	c_{Gasphase} [mol/L]	c_{max} [mol/L] in PFD-Lösung	$N_{\text{Gas}}/N_{\text{PFD}}$ in PFD-Lösung
O ₂	1,3319	0,81	$4,162 \cdot 10^{-2}$	$3,4 \cdot 10^{-2}$	1/123
CO ₂	1,8408	3,16	$4,183 \cdot 10^{-2}$	0,132	1/31
N ₂	1,1655	0,59	$4,160 \cdot 10^{-2}$	$2,5 \cdot 10^{-2}$	1/169
PFD	1917 ^[341]	-	-	4,149	-

Es fällt auf, dass die Konzentrationen von O₂ und CO₂ in PFD etwa das Doppelte der Werte betragen, die aus den Literaturdaten errechnet wurden. Dies kann natürlich einerseits daran liegen, dass die Literaturwerte bei einer höheren Temperatur bestimmt wurden, andererseits könnte die Annahme konstant bleibender Streuquerschnitte falsch sein. Bei den Literaturwerten wurde jedoch weder eine Methode der Bestimmung beschrieben, noch sind die in der Literatur aufgeführten Werte konsistent bezüglich der angegebenen Temperaturen^[37,80,125,135,331,340]. Wenn allerdings die relativen Werte ($c_{\text{O}_2}/c_{\text{CO}_2}$) miteinander verglichen werden, so fällt auf, dass beide Methoden ein Verhältnis von 0,28 liefern, sofern man bei den Raman-Daten den von Sauerstoff ($1,0^{[339]}$ rel. zu N₂) abweichenden Streuquerschnitt von CO₂ ($1,1^{[339]}$ rel. zu N₂) berücksichtigt. Diese bemerkenswerte Übereinstimmung kann zweideutig interpretiert werden: Entweder ändern sich die Streuquerschnitte von O₂ und CO₂ beim Übergang in die flüssige Phase im gleichen Ausmaß oder bei den Literaturdaten oder diesen Raman-Daten wurde der gleiche systematische Fehler in beiden Messungen begangen. Die abweichende Temperatur könnte natürlich auch für diese Diskrepanz verantwortlich sein, falls die Temperaturabhängigkeit dieser Gase in diesem Intervall einen ähnlich starken Abfall zeigt. Eine derartig starke Abnahme der Löslichkeit in einem so kleinen Temperaturintervall ist jedoch unwahrscheinlich und würde eher mit nachgelagerten Gleichgewichten korrelieren, wie es z.B. bei der Lösung von CO₂ in Wasser bekannt ist^[336].

In der Literatur konnte kein valider Vergleichswert für die N₂-Löslichkeit in PFD bei 20 °C aufgefunden werden. Insofern ist diese Bestimmung, insbesondere in Hinsicht auf die spektroskopische Determination von Henry-Konstanten, ein Novum. Dies gilt auch für die O₂- und CO₂-Daten, die ebenfalls bei 20 °C erhalten wurden. Auch wenn die Genauigkeit der Absolutwerte nicht eindeutig ist, so geben diese Messdaten jedoch den allgemeinen Trend der

Löslichkeiten wieder, der qualitativ in Perfluorcarbonen beobachtet wird ($\text{CO}_2 \gg \text{O}_2 > \text{N}_2$)^[135,342].

4.3.2 Quantenchemische Berechnungen

Um weiteres Licht auf die Löslichkeit physiologischer Gase in PFD zu werfen, wurden quantenchemische Berechnungen angestrengt. Hierbei wurde mit dem Programm Turbomole^[343] gerechnet und zunächst eine Geometrieoptimierung mit dem Basissatz def2-SVP (Split-Valence Double-Zeta) des Systems O_2 in *cis*-PFD oder O_2 in *trans*-PFD vorgenommen (H. Somnitz, persönliche Mitteilung^[344]). Als Methode wurde das Hybrid-Dichtefunktional B3LYP inklusive der empirischen D3-Dispersionskorrektur (v.3 nach Grimme) eingesetzt, da diese Methode insbesondere für schwach wechselwirkende Systeme geeignet ist (H. Somnitz, persönliche Mitteilung^[344]). Zudem wurde der Einfluss des Lösungsmittels mit dem COSMO-Modell unter Zuhilfenahme der Dielektrizitätskonstante ($\epsilon^{293,15\text{ K}} = 1,944$ ^[345,346]) berücksichtigt (H. Somnitz, persönliche Mitteilung^[344]). Die nachfolgenden Geometrien (Abb. 39) wurden zudem als stationäre Punkte verifiziert, d.h. der Gradient ist Null und die zweiten Ableitungen (Hesse-Matrix) besitzen keine negativen oder imaginären Eigenwerte (H. Somnitz, persönliche Mitteilung^[344]):

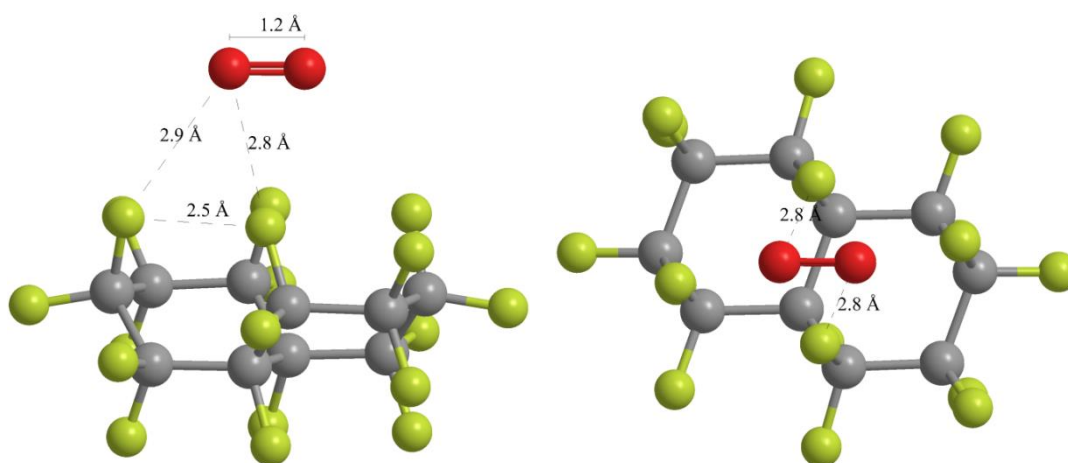
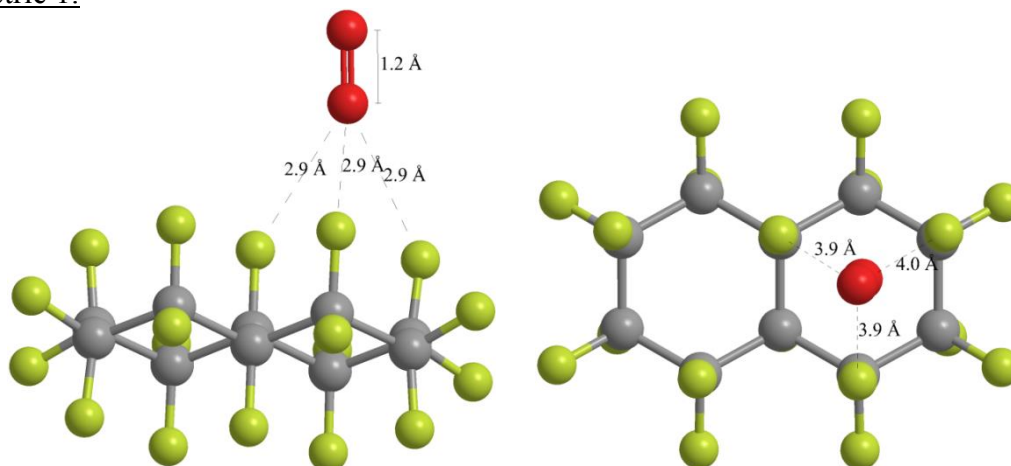


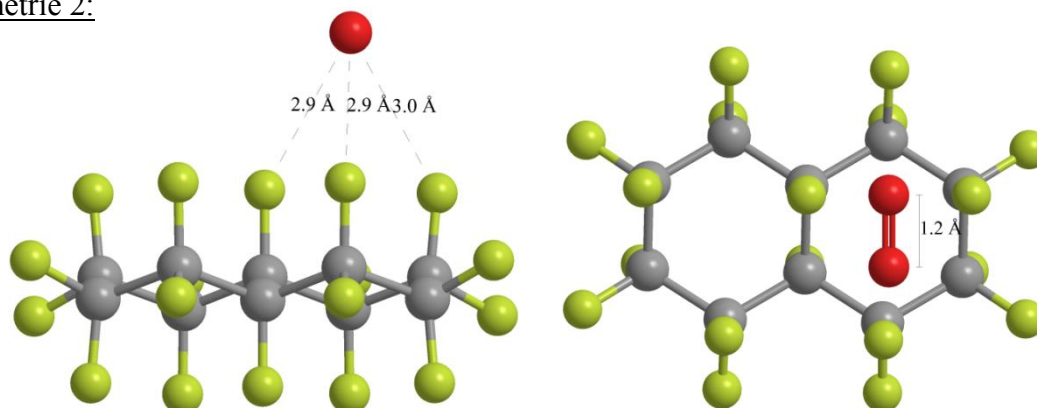
Abb. 39: Seitenansicht (links) und Draufsicht (rechts) der geometrieoptimierten Struktur (B3LYP-D3-COSMO/def2-SVP) des *cis*-Perfluordecalin- O_2 -Systems (H. Somnitz, persönliche Mitteilung^[344]).

Während sich für das O₂-*cis*-PFD-System nur ein Energieminimum ergibt, in dem der Sauerstoff zentrumssymmetrisch über den Ringen lokalisiert ist, so ergeben sich für das O₂-*trans*-PFD-System drei Minima (Abb. 40):

Geometrie 1:



Geometrie 2:



Geometrie 3:

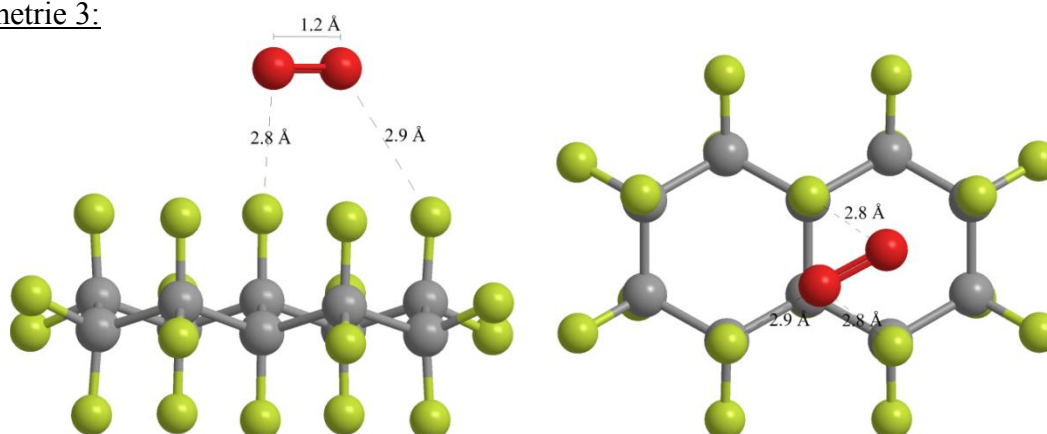


Abb. 40: Seitenansicht (links) und Draufsicht (rechts) der geometrieoptimierten Strukturen (B3LYP-D3-COSMO/def2-SVP) des *trans*-Perfluordecalin-O₂-Systems (H. Somnitz, persönliche Mitteilung^[344]).

Aus diesen Rechnungen ergibt sich, dass sich das Energieminimum des O₂ eher über dem Zentrum einer der beiden *trans*-PFD-Ringe befindet. Die Geometrie 3 ähnelt dabei noch am meisten dem Energieminimum aus der Rechnung mit dem *cis*-PFD. Diese Geometrie stellte sich in den nachfolgenden Berechnungen der Wechselwirkungsenergien auch als die energetisch günstigste heraus.

Für die Berechnungen der Wechselwirkungsenergien der so gefundenen geometrieoptimierten Strukturen wurde die gleiche Methode eingesetzt, jedoch mit einem größeren Basissatz (def2-TZVP, persönliche Mitteilung von H. Somnitz^[344]). Bei Berechnungen mit einem endlichen Basissatz auf Fragmenten eines Supermoleküls können jedoch BSSE-Fehler (basis set superposition error) evolvieren, die unter Zuhilfenahme eines größeren Basissatzes (hier def2-QZVP) korrigiert werden können (H. Somnitz, persönliche Mitteilung^[344]). Die Ergebnisse dieser Rechnung sind in der folgenden Tabelle (Tab. 4) zusammengestellt:

Tab. 4: Wechselwirkungsenergien der geometrieoptimierten Strukturen (B3LYP-D3-COSMO/def2-QZVP) von O₂ und den *cis*- und *trans*-Isomeren des Perfluordecals (H. Somnitz, persönliche Mitteilung^[344]).

Molekülsystem	Wechselwirkungsenergien [kJ/mol]
<i>cis</i> -PFD + O ₂	-3,79
<i>trans</i> -PFD + O ₂ (1)	-3,08
<i>trans</i> -PFD + O ₂ (2)	-3,08
<i>trans</i> -PFD + O ₂ (3)	-3,67

Beim Vergleich der beiden absoluten Minima des *cis*- und des *trans*-Systems wird deutlich, dass sich die oben angedeutete Ähnlichkeit der Geometrien auch in ihrer Energie zeigt. Die Energieabsenkung für O₂ ist mit dem *cis*-Isomer nur marginal größer. Daraus könnte man zwar eine minimal bessere Löslichkeit mit *cis*-PFD schließen, allerdings konnte nur eine einzige Geometrie fixiert werden, die für eine dispersive Wechselwirkung infrage kommt. Beim *trans*-PFD sind es jedoch drei Geometrien, deren statistische Besetzung entropische Beiträge zum System entrichten können. Ergo könnte die Löslichkeit von O₂ in *trans*-PFD sogar größer sein als in kondensierter Phase des *cis*-Isomers, da beim Übergang vom gasförmigen O₂ in die *trans*-PFD-Phase weniger Entropieverlust durch die größere Komponentenvielfalt resultieren könnte. Inwieweit sich die in den NMR-Messungen gefundene Konformationsdynamik des *cis*-Isomers (vgl. Kap. 4.2.5) auf die O₂-Löslichkeit

auswirkt, kann hier nicht deutlich herausgestellt werden, da sich diese Rechnungen nur auf die energetisch günstigste Konformation beziehen, die aber auch am häufigsten statistisch besetzt wird.

Insgesamt geht aus diesen Daten hervor, dass die Wechselwirkungsenergien relativ klein und die Distanzen zwischen O₂- und PFD-Molekülen, verglichen mit gewöhnlichen chemischen Bindungen^[308], relativ groß sind. Dadurch können die mehrfach aus den Raman-Daten gezogenen Schlussfolgerungen auf die physikalische Natur der Lösung validiert werden.

4.4 Verhalten in biologischer Umgebung

Mit unseren Kooperationspartnern vom Institut für Physiologische Chemie des Universitätsklinikums Essen, Herr Prof. Dr. Dr. Herbert de Groot und MitarbeiterInnen, wurden unter Verwendung von männlichen Ratten vom Stamm Wistar (*Rattus norvegicus*) Perfusionen an exstirpierten Lebern und intravenöse Infusionen an narkotisierten Ratten mit PnBCA-PFD-Nanokapseldispersionen vorgenommen.

Anhand dieser *ex vivo* und *in vivo* durchgeführten Versuche wurden Vitalitäts- und Toxizitätsparameter aufgenommen und die Sauerstoffversorgung während der Leberperfusion unter biologischen Bedingungen evaluiert.

Die physiologischen Versuchsergebnisse der Leberperfusionen, als Pendant zu den physikalisch-chemischen Ergebnissen, werden in dieser vorliegenden Arbeit nicht dargestellt und diskutiert.

Die intravenösen Infusionen wurden von Dipl.-Chem. Indra N. Waack und Dr. Katja B. Ferenz durchgeführt. Die Leberperfusionen wurden ebenfalls von Dipl.-Chem. Indra N. Waack und Dr. Katja B. Ferenz durchgeführt, sowie von Dr. Thorsten Bramey, Thomas Capelli und den technischen AssistentInnen.

4.4.1 Intravenöse Infusionen

Informationen über die Verabreichung der Dosen, eingesetzte Versuchstiere, Anästhesie, Analgesie, Versuchsdurchführung und die experimentellen Parameter, sowie das Biomonitoring, werden ausführlich in einer gemeinsamen Veröffentlichung^[123]

zusammengefasst. Aus den darin vorgestellten Ergebnissen geht hervor, dass die in dieser Arbeit synthetisierten *Pn*BCA-PFD-Nanokapseln im Blutstrom der Ratten erhalten bleiben. Wichtig ist außerdem, dass alle Versuchstiere den Beobachtungszeitraum ohne schwerwiegende Komplikationen überlebten.

Diese Tatsachen belegen, dass das *Pn*BCA-PFD-Nanokapselsystem ein vielversprechender Ansatz für die Entwicklung von künstlichen Sauerstoffträgern ist.

4.4.2 Leberperfusionen

Die Leberperfusionen, die im Zeitraum dieser Arbeit mit extrakapsulärem oder intrakapsulärem Perfusionsmedium durchgeführt worden sind, dienten der Determination der Sauerstoffversorgung des Organs Leber. Es erfolgte die Etablierung des hepatischen Monitorings der physiologischen und biochemischen Stoffwechselfparameter und Marker, wie z.B. die Metabolit-Konzentrationen^[347-351] in der explantierten perfundierten Rattenleber. Anhand der kontinuierlichen Überwachung und Evaluierung dieser Indikatoren konnten nach Explantation und Perfusion der Leber essentielle Schlussfolgerungen hinsichtlich Verbesserungen, Konstanz und Schädigungen der Leberfunktionen getroffen werden; ferner konnten Schlüsse gezogen werden, inwieweit eine suffiziente Sauerstoffversorgung der Leber bewerkstelligt werden konnte oder nicht.

Der experimentelle Aufbau der Leberperfusionsexperimente ist in nachfolgender Abbildung (Abb. 41) gezeigt:

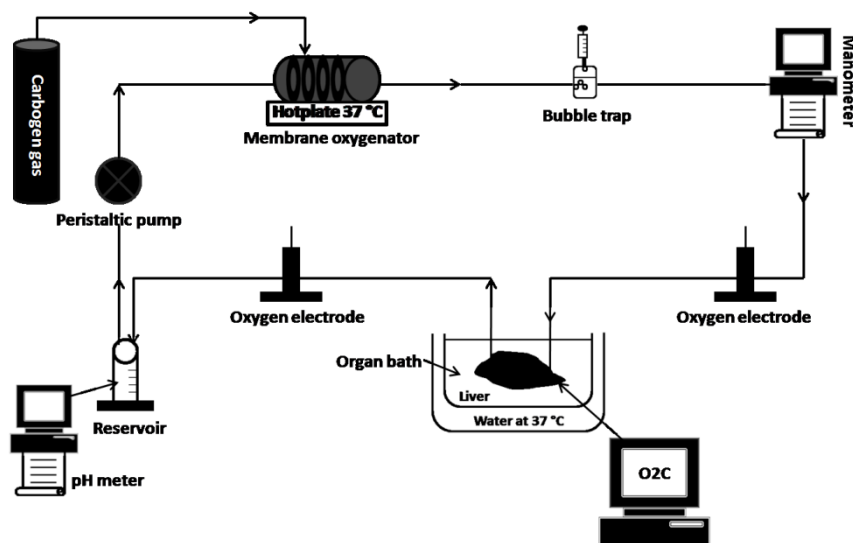


Abb. 41: Schematische Darstellung des Rattenleberperfusionssystems. Schema von Indra N. Waack, mit freundlicher Genehmigung vom AK H. de Groot.

Für das Perfusionsexperiment wurden unter Einhaltung des pH-Wertes des Blutes die angesetzten Nanokapseldispersionen mit KH-Puffer verdünnt, bevor diese der im Versuchsaufbau integrierten und nach einer Standardarbeitsweise^[352] präparierten Rattenleber zugeführt wurden.

Die Versuchstiere wurden vor Perfusionsbeginn und deren explantierte Lebern nach Perfusionsende gewogen. Die Versuchstiere waren zum Zeitpunkt der Leberexstirpation zwei bis drei Monate alt und die Massen der entnommenen Lebern betrugen zwischen 16-17 g^[353]. Vor der vollständigen Leberisolation wurde die Ratte in einen Begasungstopf gesetzt und einer Inhalationsnarkose unterzogen (mit 2 % Isofluran[®] und 100 % Sauerstoff), dann wurde die Ratte auf eine Heizplatte gelegt und erhielt eine Inhalationsnarkose über eine Maske, ebenfalls mit Isofluran/O₂^[352]. Nach Desinfizierung des Abdomens wurde das Versuchstier einer Reflexprüfung unterzogen und bei negativer Indikation die Leber abdominal-chirurgisch entfernt^[352].

In diesem kontinuierlich-rezirkulierenden Rattenleberperfusionskreislauf (Abb. 41) wurde das sauerstoffangereicherte Perfusionsmedium mittels peristaltischer Pumpe gefördert, die die Pumpfunktion im künstlichen Blutkreislauf übernahm und so als „künstliches Herz“ fungierte^[155]. Das sauerstoffarme Medium wurde zur Oxygenierung zum Membranoxygenator befördert, wo es in Analogie zur Lunge während der Passage des Gerätes mit Sauerstoff angereichert wurde^[155]. Die sauerstoffangereicherten Nanokapseln erreichten die im geschlossenen Kreislauf integrierte Leber^[155]. Beim Passieren der Leber kam es zur Sauerstoffabgabe der Nanokapseln aufgrund des dort vorherrschenden geringen Sauerstoff- und hohen Kohlendioxidpartialdrucks^[155]. Bei der Sauerstoffentladung der Nanokapseln kam es zur Sauerstoffverdrängung durch die Kohlendioxidaufnahme, somit wurde die Sauerstofffreisetzung der Nanokapseln intensiviert^[155]. Dies vollzog sich in Analogie zum Bohr-Effekt, der beim Erythrozyten-Gastransport stattfindet^[155]. Nach Wiedereintritt der Nanokapseldispersion in den Oxygenator (Carbogengas^[353,354] aus 95 % O₂ und 5 % CO₂) vollzogen sich die Gasaustauschprozesse, ursächlich durch die inversen Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdrücke, diametral^[155]. Analoge Prozesse dieser Nanoerythrozyten als artifizielle Sauerstoff- und Kohlendioxidträger werden bei animaler und humaner Applikation prädiktiert^[155].

In diesem retrograden Perfusionskreislauf wurden zur Kontrolle der hepatischen Sauerstoffversorgung und des -verbrauchs zwei Clark-Sauerstoffelektroden zur kontinuierlichen Messung des Sauerstoffpartialdrucks im Perfusionsmedium, sowohl vor als

auch nach der Leberpassage, integriert^[354]. Des Weiteren wurde der Perfusionsdruck mittels Druckumwandler vor der Rattenleber gemessen^[354], sowie der pH-Wert im Kapsel-Puffer-Reservoir aufgezeichnet. Änderungen des Perfusat-pH-Wertes konnten anhand einer pH-Elektrode, die in das Reservoir immigriert ist, detektiert werden.

Zu definierten Zeitpunkten wurden Perfusatproben posthepatisch gezogen^[352]. Bei der Nanopartikelperfusion wurden Perfusatproben zur Partikelanalyse entnommen^[352].

Mittels VIS-Spektroskopie, als Indikator für eine ausreichende Sauerstoffversorgung des perfundierten Lebergewebes, wurde zum unmittelbaren Vergleich die Sauerstoffversorgung der Lebern während der Perfusion mit kapselfreiem und kapselhaltigem KH-Puffer überwacht^[354]. Indizierend waren die mitochondrialen Cytochrom-Redoxstadien^[155,354]. Der Reduktionszustand bzw. die reduzierten Stadien der mitochondrialen Cytochrome waren bei Sauerstoffunterversorgung oder -absenz (kapselloser KH-Puffer) vorzufinden, wobei dies zur Beeinträchtigung der Zellfunktion und des Überlebens durch insuffiziente ATP-Versorgung des perfundierten Organs führte^[155,354]. Hingegen waren die oxidierten Cytochromzustände (kapselhaltiger KH-Puffer) bei Sauerstoffpräsenz der Atmungskette gegenwärtig, und eine vollständige Oxidation der messbaren Cytochrome aa3 und c war evident^[155,354].

Die Vitalität der explantierten perfundierten Leber wurde anhand von Messungen der freigesetzten Leberenzymaktivitäten in den Perfusatproben bewertet, wie die Laktatdehydrogenase (LDH) und die Aspartat (ASAT)- und Alanin (ALAT)-Aminotransferase^[354]. Die Elektrolytzusammensetzung (K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Cl^-) und der Glucose- und Laktatgehalt der Perfusatproben, die nach der Leberpassage gezogen wurden, wurden in temporalen Abständen mit einem Blutgasmessgerät verfolgt^[354].

Nach erfolgter Leberperfusion wurde das Organ evaluiert und konserviert (Formalin)^[352]. Die Leber wurde außerdem, nach Wägung und Fotografie, einer histologischen Untersuchung unterzogen^[352]. Die Histologie diente der möglichen Lokalisierung von Einzelkapseln, agglomerierten, akkumulierten und phagozytierten Kapseln in ihrem nativen Kontext; ebenso können Embolien in den Gewebeschnitten erkannt werden^[352].

Drei verschiedene Perfusionsmedien, KH-Puffer mit und ohne Synperonic® PE/F68 (Abb. 42 KH-Puffer ohne Synperonic® PE/F68), sowie PnBCA-PFD-Nanokapseln, wurden zum Vergleich für die Rattenleberperfusion eingesetzt, physiologisch evaluiert und das makroskopische Erscheinungsbild der Lebern fotografisch festgehalten. Exemplarisch sei

eine der Lebern aus dem Kontrollexperiment folgend gezeigt, die einen ähnlichen Zustand aufweist wie die Lebern in den anderen Versuchen:



Abb. 42: Mit KH-Puffer-perfundierte Rattenleber. Es sind keine makroskopischen Veränderungen, wie z.B. Okklusionen, erkennbar. Foto von Indra N. Waack, mit freundlicher Genehmigung vom AK H. de Groot.

Visuell können keine Kapselagglutinationen in den Experimenten mit PnBCA-PFD-Nanokapseln erkannt werden.

Mögliche Okklusionserscheinungen von Nanokapseln im Lebergewebe könnten auf erhöhte Elektrolytpräsenz in den betroffenen Arealen hinweisen und folglich eine Agglomeration und Akkumulation der Kapseln auslösen, die zum irreversiblen Verkleben und Verklumpen jener in den Kapillargefäßen und im Lebergewebe führen. Dabei könnten makroskopisch aufgehellte oder abgestorbene Leberareale allerdings sauerstoffunterversorgte oder -unversorgte Leberzellen und Lebergewebe indizieren, die Evidenz auf Hypoxie oder Ischämie geben könnten.

Jedoch wurden in allen durchgeführten Experimenten keine derartigen Phänomene beobachtet, was ein weiteres Indiz für diesen aussichtsreichen Nanokapsel-Ansatz für künstliche Sauerstoffträger ist. Mit PnBCA-PFD-Nanokapseln kann eine optimale untoxische Sauerstoffversorgung eines Organs erfolgen^[155]. Außerdem wurde bei den Leberperfusionen mit Kontrollmedium (kapselvakant) eine Sauerstoffunterversorgung, sogar bei einem fünffachen physiologischen Durchfluss, gefunden^[155]. Im Gegensatz dazu, konnten die Ansätze mit Nanokapseln eine optimale Sauerstoffversorgung liefern. Auch aus den anderen Experimenten, die z.B. auf die Vitalität der Lebern abzielten, konnten keine negativen Beeinflussungen interpretiert werden.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1 Synthese der PnBCA-PFD-Nanokapseln

Eine mikroskopische Untersuchung mittels Dunkelfeldmikroskopie und *Nanoparticle Tracking* unmittelbar nach der Nanokapselsynthese ergibt die nachstehende Größenverteilung (Abb. 43), die stellvertretend und repräsentativ für alle Standardsynthesen ist:

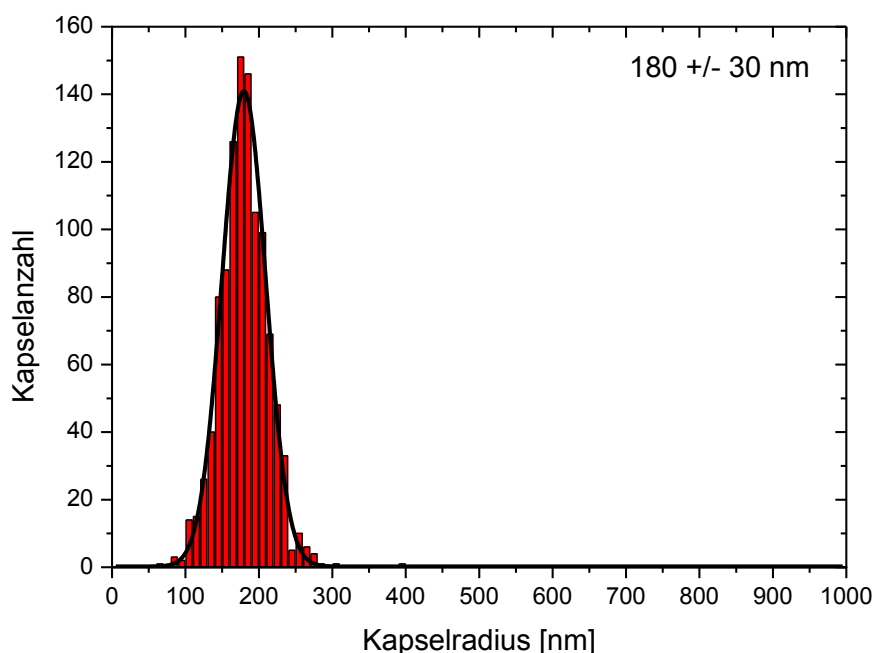


Abb. 43: Größenverteilung von einem PnBCA-PFD-Nanokapsel-Standardansatz.

Die Klassenbreite in den Histogrammen entspricht dem Methodenfehler von etwa ± 10 nm. Alle in dieser Arbeit gemessenen Größenverteilungen der PnBCA-PFD-Nanokapseldispersionen wurden mittels verbessertem *Nanoparticle Tracking* während der Dunkelfeldmikroskopie analysiert und mittels Gauß-Funktion angepasst. Ausnahmen davon, sind explizit gekennzeichnet. Außerdem ist hier und ebenfalls in allen nachfolgenden Histogrammen der mittlere hydrodynamische Radius neben seiner Fehlerbreite (doppelte Standardabweichung) angegeben.

5.2 Variation der PnBCA-PFD-Nanokapselpräparation

5.2.1 Variation der Lösungsmittelkonzentrationen

Die Molenbrüche der organischen Lösungsmittel (x_O), sowie die Molenbrüche des Wassers (x_A), wurden getrennt voneinander verringert und erhöht. Nach der Synthese wurden die Kapseldispersionen mittels der Dunkelfeldmikroskopie und dem angeschlossenen *Nanoparticle Tracking* hinsichtlich ihrer Größenverteilungen untersucht. Bestimmte Ansätze, die divergente multimodale Größenverteilungen aufzeigen, wurden durch Aufnahme von ^{19}F -NMR-Spektren (NMR-Spektrometer, Bruker DRX 500, Fluorresonanzfrequenz = 500 MHz) untersucht, ob PFD in den Dispersionen enthalten ist und wenn ja, in welchem Ausmaß. Die ^{19}F -NMR-Spektren wurden anhand von einfachen Einzelpulsexperimenten aufgenommen. Dazu wurden die chemischen Verschiebungen unter Verwendung eines externen Standards (deuteriertes Hexafluorisopropanol, HFIP) ermittelt.

5.2.1.1 Variation des Molenbruchs der organischen Phase (x_O)

Hierbei wurden ausschließlich die eingesetzten Volumina der organischen Lösungsmittel, das sind die von Ethanol, Aceton und Dichlormethan, in einem feststehenden Volumenanteil variiert. Die Volumina aller weiteren Bestandteile wurden entsprechend der Standardsynthese eingesetzt. Bei Betrachtung des mittleren hydrodynamischen Radius und der Standardabweichung ist keine signifikante Tendenz bei Verkleinerung von x_O festzustellen (Abb. 44). Die Probenbezeichnung Nr. 1 in Abb. 44 kennzeichnet die Standardsynthese, wie schon oben erwähnt. Bei einem Molenbruch von 0,0228 (Nr. 2 in Abb. 44) ist das Minimum von x_O erreicht, wo das PFD nicht mehr vollständig gelöst wurde. Diese Tatsache könnte zu größeren Emulsionströpfchen führen wodurch auch größere Kapseln gebildet werden. Jedoch sind diese Beobachtungen im Rahmen des Methodenfehlers schwer nachvollziehbar und außerdem ist die PFD-Löslichkeit in diesem x_O -Bereich zu klein. Die Abnahme des Molenbruchs der organischen Lösungsmittel ist durch das Auftreten einer Mischungslücke in der PFD/organischen Lösungsmittelmischung begrenzt, z.B. die Synthese mit einem x_O von 0,0228 (Nr. 2).

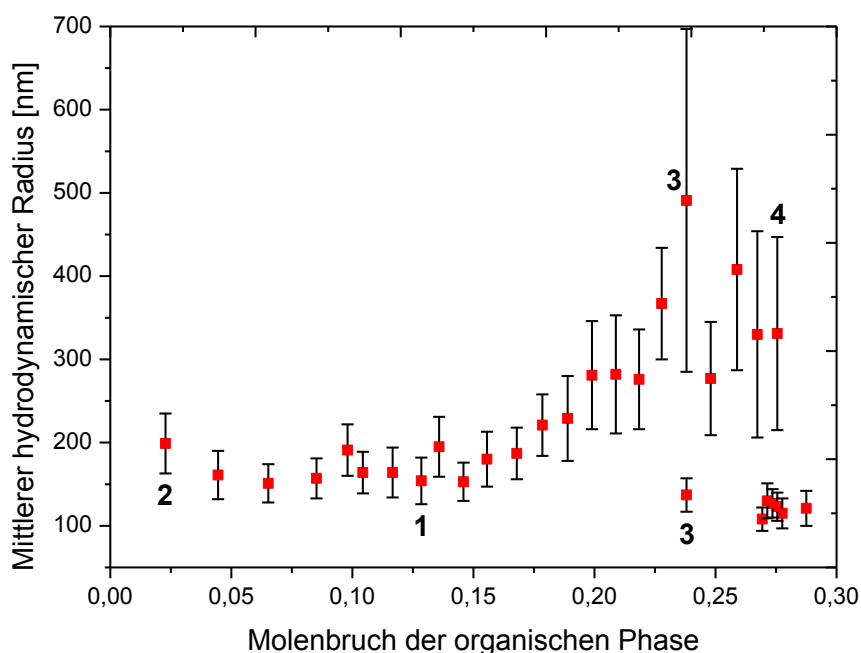


Abb. 44: Abhängigkeit zwischen dem mittleren hydrodynamischen Radius und dem Molenbruch der organischen Phase (x_0), Nr. 1-4 bezogen auf den Text.

Die Auswirkung des Anstiegs des organischen Lösungsmittels auf den mittleren hydrodynamischen Radius ist gleichermaßen in Abb. 44 dargestellt. Der mittlere hydrodynamische Radius steigt kontinuierlich mit zunehmendem x_0 bis 0,2380 (Abb. 44, Nr. 3). Diese und die nachfolgenden Synthesen zeigen Anteile von Partikeln mit hydrodynamischen Radien im Bereich von 100-130 nm. Diese Tendenz ist ebenso in den verbundenen Standardabweichungen (s. Fehlerbalken) widerspiegelt. Ausgehend von diesen Ergebnissen sind keine oder nur geringe Mengen an Kapseln gebildet worden. *Gallardo et al.*^[183] untersuchten unterschiedliche Systeme und bestimmten, dass der mittlere hydrodynamische Durchmesser der Nanosphären ungefähr 100 nm beträgt. Die Synthesen mit einem x_0 größer als 0,2380 (Abb. 44, Nr. 3) sind vermutlich nicht mehr in der metastabilen Ouzo-Region lokalisiert. Das Auftreten von bimodalen Größenverteilungen von Nanokapseln und Nanosphären bei diesen Molenbrüchen ($> 0,2380$) unterstützen diesen Gedanken (Abb. 45 und Abb. 46). Ein möglicher Grund für die Bildung von Nanosphären anstelle von Nanokapseln könnte auch in einer höheren Polymerisationsrate infolge eines Lösungsmittelleffektes oder einer Hemmung der Kapselbildung zugeschrieben werden. Beide Größenverteilungen in diesen Histogrammen wurden mithilfe von Gauß-Regressionen in einer Dekonvolution analysiert, wie nachstehend gezeigt ist:

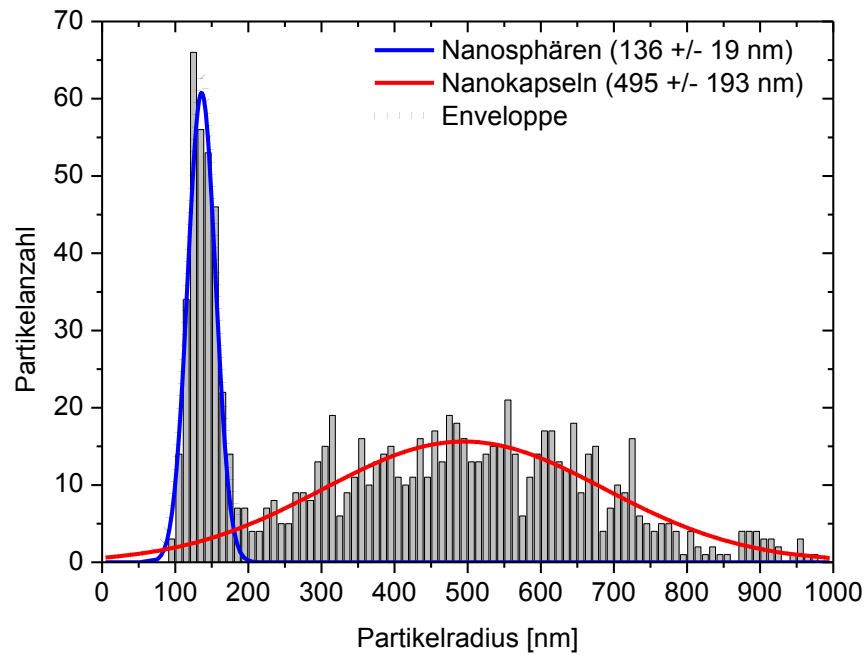


Abb. 45: Größenhistogramm von Nanosphären und Nanokapseln einer Partikeldispersion ($x_0 = 0,2380$), analysiert mittels *Nanoparticle Tracking* und mittels Gauß-Funktionen dekonvolviert.

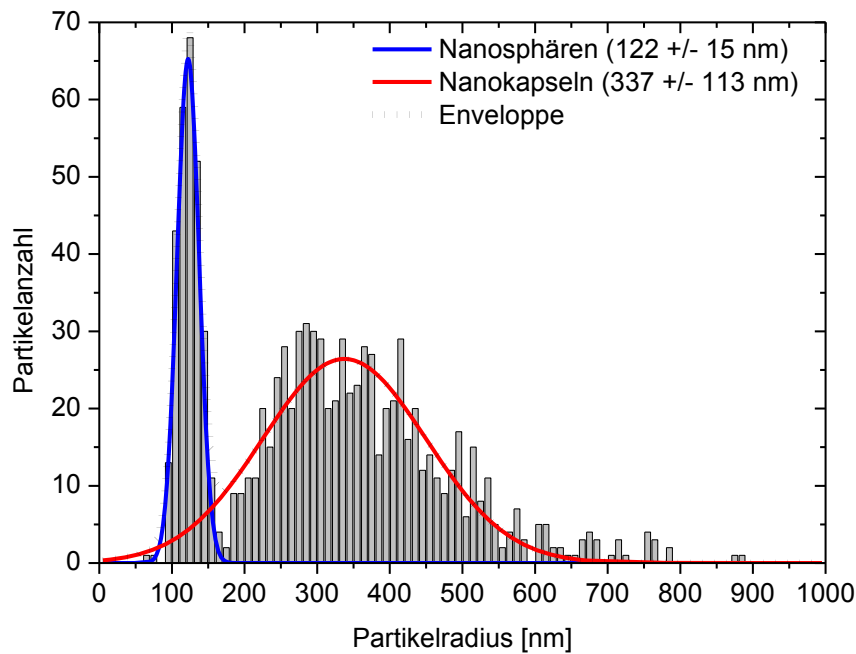


Abb. 46: Größenhistogramm von Nanosphären und Nanokapseln einer Partikeldispersion ($x_0 = 0,2755$), analysiert mittels *Nanoparticle Tracking* und mittels Gauß-Funktionen dekonvolviert.

Die überraschende Bildung von Nanokapseln während der Synthese mit einem x_O von 0,2755 (Abb. 44, Nr. 4), lediglich nach Zugabe eines unbestimmten Volumens an organischer Phase, könnte durch Verlassen der Ouzo-Region erklärt werden. Anfänglich ist das Merkmal für eine stabile Ouzo-Region während des Zutropfens der organischen in die wässrige Phase noch erfüllt. Vermutlich werden erst nach Verlassen dieser Region im Verlauf der Synthese bevorzugt Nanosphären gebildet. Die Bildung von Nanosphären und Nanokapseln wird auch in den Synthesen mit den Molenbrüchen 0,2693, 0,2735 und 0,2875 beobachtet. Allerdings ist die Bildung der Nanokapseln bei diesen Molenbrüchen weniger ausgeprägt, indiziert aber bereits das Erreichen der Stabilitätsgrenze dieses Systems.

Die Betrachtung der ^{19}F -NMR-Spektren, die von den Proben mit einem x_O von 0,2589 und 0,2673 (Abb. 47) erhalten werden haben bestätigt, dass eine Doppelpopulation an Nanosphären (bzw. Polymerflocken) und Nanokapseln detektiert werden. Vergleichsweise zu anderen Messungen konnte ein geringerer Molenbruch des PFD, der in der Signalintensität wiedergegeben ist, detektiert werden. Weiterhin unterstützt die ^{19}F -NMR-Messung der Probe mit einem Molenbruch der organischen Phase von 0,2776 (Abb. 47) die These, dass diese Synthese bereits außerhalb der Ouzo-Region liegt. Die repräsentativen Resonanzen bei etwa $-194,5$ ppm und $-195,0$ ppm, sowie die übrigen Fluor-Resonanzen, fehlen nämlich in dieser Messung. Somit kann ausgehend von diesem Molenbruch die Grenze abgesteckt werden, ab der keine Kapseln mehr gebildet werden. Über den Verbleib des PFD kann im Grunde nur spekuliert werden. Wahrscheinlich ist das PFD an den (unteren) Wandungen des Reaktionsgefäßes, entsprechend der sehr hohen Dichte sowie der geringen Löslichkeit, verloren gegangen.

Die Entwicklung der Größenverteilung innerhalb der Variation von x_O ist schwer zu interpretieren. Messungen an *trans*-Anethol/Ethanol/Wasser-Systemen zeigen, dass das Ethanol- zu Wasserverhältnis eine starke Wirkung auf die Ostwald-Reifungsrate hat. Die Ergebnisse erscheinen so, dass das Ansteigen des Ethanol- zu Wasserverhältnisses eine abnehmende Ostwaldreifungsrate bewirkt, obwohl theoretische Betrachtungen von *Scholten et al.*^[160] und *Sitnikova et al.*^[158] die gegensätzliche Tendenz prognostizieren. Dadurch wird primär erwartet, dass die Ostwald-Reifung ausschließlich in gewöhnlichen Emulsionen stattfindet, aber nach *Ganachaud und Katz*^[157] sind Emulsionen, die durch den Ouzo-Effekt gebildet werden, hauptsächlich von der Ostwald-Reifung befreit. Für das in diesem Falle angestiegene x_O wird deswegen vorgeschlagen, nicht die Ostwald-Reifung als verantwortlich für den beobachteten Anstieg der Kapselgröße zu betrachten. Darüber hinaus wird vermutet, dass die Agglomeration von Nanokapseln in dieser wechselnden Umgebung

verstärkt wird. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die kritischen Schritte des Kapselbildungsmechanismus durch den unterschiedlichen Lösungsmiteleinsatz, wie oben aufgeführt (Kap. 2.3.1), beeinflusst werden.

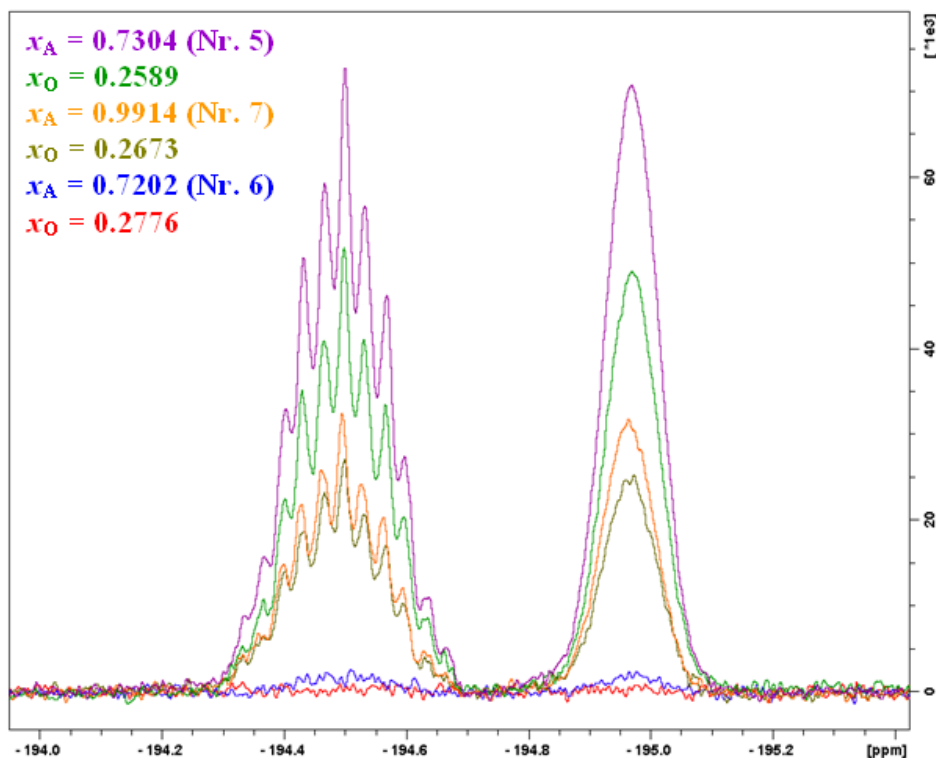


Abb. 47: ^{19}F -NMR-Spektren zum Nachweis von PFD in unterschiedlichen Proben.

5.2.1.2 Variation des Molenbruchs der wässrigen Phase (x_A)

Ebenso wurde auch der Wassergehalt variiert, um den Einfluss auf die Nanokapselgröße zu klären. Dabei wurde die optimierte Zusammensetzung wie in der Standardsynthese verwendet und das Wasservolumen variiert. Die Ergebnisse für die Variation von x_A sind in Abb. 48 zusammengefasst. Es zeigen sich spiegelbildliche Tendenzen für die Variation von x_A im Vergleich zur Variation von x_O (Abb. 44). Wahrscheinlich wird die Ouzo-Region für die beiden Diagramme bei einem x_A von ungefähr 0,73 verlassen.

Der hydrodynamische Radius steigt kontinuierlich bis die Probe mit einem x_A von 0,7304 (Abb. 48, Nr. 5) erreicht ist. An diesem Punkt kommt es zu einem plötzlichen Sinken der Kapselgröße bis zu einem x_A -Wert von 0,7202 (Abb. 48, Nr. 6), was auf einen Wechsel im Partikelbildungsmechanismus hinweist. Die Tendenz von zunehmenden hydrodynamischen Radien mit einem sinkendem x_A wird auch in den Standardabweichungen reflektiert und

somit scheint es wahrscheinlich, dass Nanosphären oder Polymerflocken gebildet wurden, wie schon oben beschrieben. Wiederholt bestätigen die ^{19}F -NMR-Spektren von verschiedenen Proben in diesem x_{A} -Bereich diese Hypothese (s. Abb. 47). Bei Synthese Nr. 6 sind keine Nanokapseln mehr gebildet worden, gemäß dem damit verbundenen ^{19}F -Spektrum besitzt es ebenso keine charakteristischen Resonanzen. Diese Resonanzsignale werden zumindest in der Probe Nr. 5 noch festgestellt. Eine plausible Erklärung für diese Beobachtung ist auch hier das Erreichen des Grenzbereiches der Ouzo-Region in Probe Nr. 5.

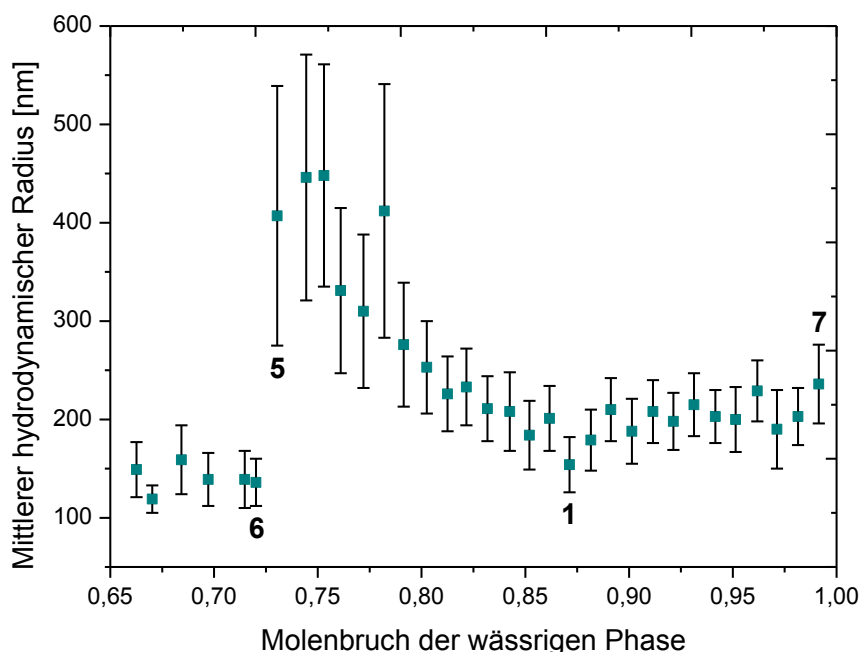


Abb. 48: Abhängigkeit zwischen dem mittleren hydrodynamischen Radius und dem Molenbruch der wässrigen Phase (x_{A}), Nr. 1, 5-7 bezogen auf den Text.

Der Anstieg von x_{A} hat nur eine geringfügige Auswirkung auf die hydrodynamischen Radien innerhalb der Standardabweichungen, die auch in diesem Fall erhöht sind. Wieder dient das korrelierte ^{19}F -NMR-Spektrum zur Bestätigung der Nanokapselpräsenz. Es wird aufgezeigt, dass die Probe mit einem x_{A} von 0,9914 (Abb. 48 und Abb. 47, Nr. 7) zwei charakteristische Banden hat, die einen Hinweis auf die Nanokapselpräsenz liefern.

Auffallend ist bei beiden Variationen (x_{O} und x_{A}), dass die Standardsynthese jeweils das Minimum an Kapselgröße bei möglichst geringer Verteilungsbreite liefert. Vermutlich befindet sich die Standardsynthese inmitten der metastabilen Ouzo-Region. Dies belegt, dass die Standardsynthese bereits weitgehend optimiert ist.

5.2.2 Variation des Perfluordecalin-Gehalts

Im Folgenden wird der Einfluss der Perfluordecalin-Menge auf die Bildung der Nanokapseln in Bezug auf ihre korrespondierende Größenverteilung gezeigt. Dies ist insofern wichtig, da hierdurch überprüft werden kann, ob es möglich ist noch mehr PFD-Volumen für eine gesteigerte Funktion als Transporter physiologischer Gase einzukapseln.

Das Volumen an Perfluordecalin ausgehend von der Standardsynthese von 200 μL wurde auf 300 μL und 400 μL erhöht. Die Monomermenge wurde bezüglich des höheren Perfluordecalin-Volumens nicht angepasst. Abb. 49 veranschaulicht, dass das PFD-Volumen keinen signifikanten Einfluss auf die Kapselgröße hat. Die mittleren hydrodynamischen Radien weisen Werte zwischen 180 ± 30 nm und 190 ± 25 nm auf. Infolge der begrenzten Löslichkeit von Perfluordecalin in diesem organischen Synthesemilieu ist es wahrscheinlich, dass bei dieser Ansatzgröße nicht mehr als 400 μL Perfluordecalin eingekapselt werden können.

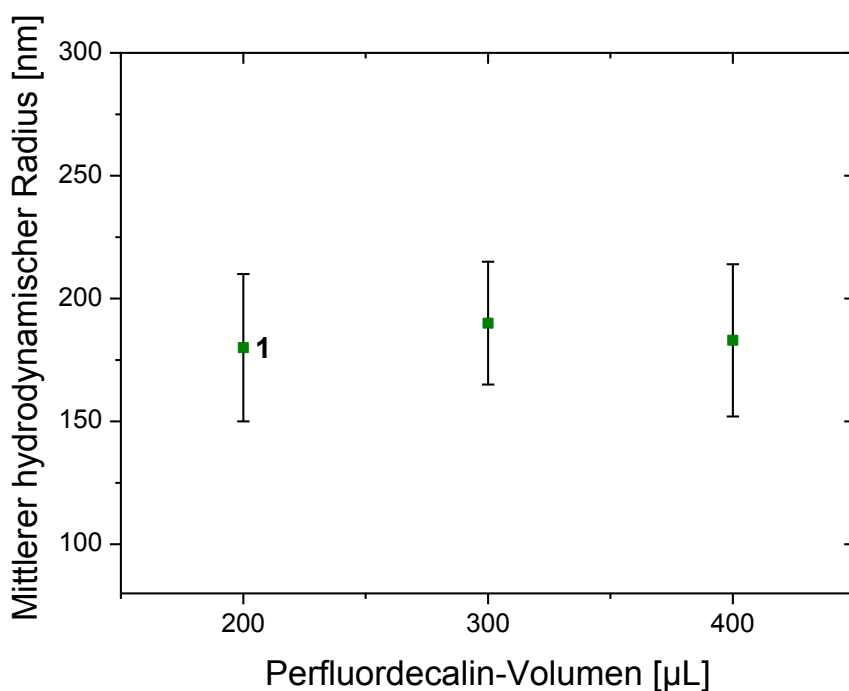


Abb. 49: Mittlere hydrodynamische Radien in der Variation des Perfluordecalin-Volumens ohne Anpassung des Monomervolumens.

Um zu demonstrieren, ob die eingesetzten PFD-Volumina einen reversiblen Gasaustausch ermöglichen, wurde ein Gassättigungsexperiment mit der ^{19}F -NMR-Spektroskopie durchgeführt, bei der der Einfluss von Sauerstoff (paramagnetisch) oder Stickstoff

(diamagnetisch) auf das resultierende Magnetfeld an den Fluoratomen der Probe ausgenutzt wird. Alle 30 s wurden dabei unter Sättigung mit Stickstoff oder Sauerstoff jeweils drei 90°-Pulsanregungen akkumuliert und anschließend die relative Verschiebung des Zentrums des Multipletts (vgl. Abb. 50) bei etwa $-194,5$ ppm aus den Einzelspektren extrahiert. Ob das Signal ausschließlich vom eingekapselten PFD stammt, kann damit nicht eindeutig belegt werden, auch wenn dies anhand der Daten aus Kapitel 5.2.1.1 und 5.2.1.2 vermutet werden kann. Da es bei den Gassättigungsversuchen mit 200 μL und 300 μL eingesetztem PFD-Volumen im Verlaufe der Messungen allerdings immer mehr zu einer erhöhten Schaumbildung kam (Tensid), die die Homogenität des Magnetfeldes beeinträchtigt, werden nachfolgend nur die drei durchgeführten Zyklen der auf 400 μL PFD erhöhten Probe gezeigt, bei der sich diese Komplikationen deutlich weniger ausprägten bzw. auswirkten:

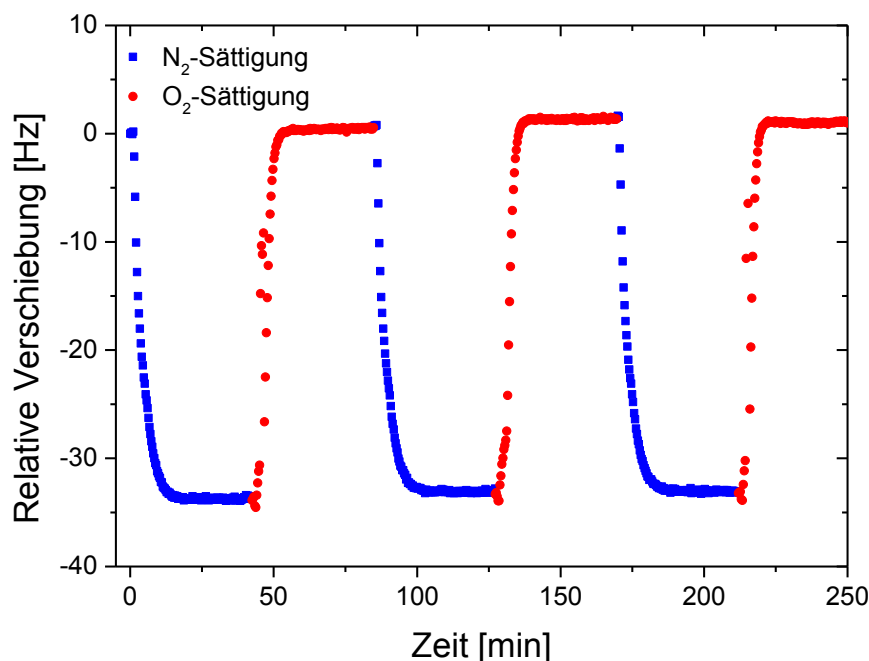


Abb. 50: Relative Verschiebungen des ^{19}F -NMR-Signals eines 400 μL PFD-enhaltenen Ansatzes unter abwechselnder Sättigung mit Stickstoff oder Sauerstoff.

Die Verläufe der drei Zyklen sind einander sehr ähnlich, was Steigung und maximale Verschiebung angeht. Daraus kann geschlossen werden, dass der Gasaustausch einen vorwiegend reversiblen Charakter aufweist und eine schnelle Gleichgewichtseinstellung trotz der anwesenden Kapselwände erfolgt. Dies ist ebenfalls unter Betrachtung der „hauchdünnen“ Kapselwände konsistent (vgl. Kap. 4.2.2).

Aus dem Signalverlauf während der Gassättigungsphasen sind weiterhin kinetische Daten gewinnbar, die allerdings in anderen Doktorarbeiten des AK C. Mayer fokussiert werden.

Hier wird lediglich statuiert, dass der Austausch reversibel ist und dass sich das Gleichgewicht innerhalb von etwa 10 Minuten in diesem System einstellt. Jedoch müssten die experimentellen Gegebenheiten genauer berücksichtigt bzw. kalibriert werden, wie z.B. die Länge des Rohrsystems und der Volumenstrom, um quantitative Aussagen treffen zu können. Die Reversibilität der Gleichgewichte respiratorischer Gase mit den synthetisierten Kapselsystemen und die maximale Gaskapazität stehen für diese Arbeit jedoch im Vordergrund.

Basierend auf der Standardsynthese wurde weiterhin die Menge des Monomers *n*BCA entsprechend dem Anstieg des PFD-Volumens angepasst, d.h. dass für 300 μL Perfluordecalin 15 μL Monomer und im Falle von 400 μL Perfluordecalin 20 μL Monomer eingesetzt wurden. Dieses Vorgehen resultiert vermeintlich in einem leichten Anstieg des mittleren hydrodynamischen Radius, wie in Abb. 51 aufgeführt ist:

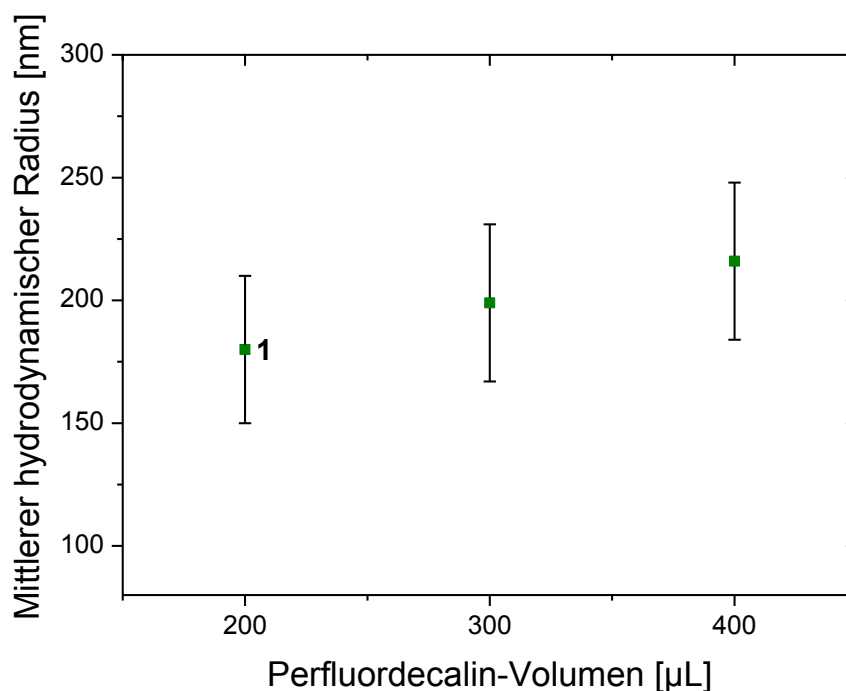


Abb. 51: Mittlere hydrodynamische Radien in der Variation des Perfluordecalin-Volumens mit Anpassung des Monomervolumens.

Die mittleren hydrodynamischen Radien variieren zwischen 180 ± 30 nm und 216 ± 32 nm im Bereich der verwendeten PFD-Volumina. Vermutlich hat die Monomerkonzentration daher einen leichten Einfluss auf den matrix-generierenden Ouzo-Effekt.

5.2.3 Variation des Lösungsmiteleinsatzes

Aufgrund der ungünstig hohen akuten Toxizität des Dichlormethans werden Nanokapselsynthesen ohne Gebrauch von diesem Lösungsmittel bevorzugt. Jedoch müssen die einzelnen Einflüsse der Lösungsmittel auf die Kapselbildung und Größenverteilung verstanden werden und wurden deshalb analysiert. Hinsichtlich dieser Thematik wurden die Synthesen gesondert, ohne die Anwesenheit von Dichlormethan bzw. Aceton, durchgeführt. Wenn das oben erwähnte Modell berücksichtigt wird, sollen diese Lösungsmittel eine verbesserte Löslichkeit des PFD in der stark ethanolhaltigen organischen Phase unterstützen. Deshalb wird nicht angenommen, dass durch Herabsetzung seiner Löslichkeit in der organischen Phase das Phasenverhalten des PFD in einer wässrigen Umgebung maßgeblich beeinflusst wird. Demzufolge kann erwartet werden, dass ein geringerer PFD-Gehalt in der organischen Phase in gleichgroßen Polymerisationsmatrices wie in einer größeren PFD-enthaltenen Phase resultieren, was aber zu einer herabgesetzten Gesamtanzahl an Nanokapseln führt. Diese Ansicht wird bestätigt durch damit verbundene experimentelle Ergebnisse, die in Abb. 52 visualisiert sind. Die Synthesen ohne Dichlormethan oder Aceton haben keinen signifikanten Einfluss auf die Nanokapselgrößen. Die abgeleiteten mittleren hydrodynamischen Radien der Kapseln, die von der Synthese ohne Dichlormethan (196 ± 42 nm) und ohne Aceton (200 ± 43 nm) erhalten werden, sind annähernd identisch. Die Langzeitstabilitätsergebnisse der Synthesen ohne Dichlormethan und ohne Aceton sind in Abb. 63 aufgeführt und legen ein ähnliches oder sogar besseres Stabilitätsverhalten in Bezug auf die Standardsynthese dar. Diese Erkenntnisse erlauben die Auslassung von Dichlormethan, wenn der Verlust an Nanokapselquantität in Kauf genommen wird, der aber z.B. durch die Hochskalierung wieder wettgemacht werden kann. Andererseits hat Dichlormethan verschiedene Vorteile, wie gute Löslichkeitseigenschaften für PFD und *n*-Butylcyanoacrylat, einen geringen Siedepunkt und schlechte Wasserlöslichkeit. Als eine Folgeerscheinung des hohen Dampfdrucks des Dichlormethans ist es aus der erhaltenen Dispersion zwar gut entfernbar, aber sein verbliebener Gehalt bedarf weiterer Beurteilung in daran anknüpfenden Untersuchungen. Insgesamt kann der Gebrauch von verschiedenen Lösungsmitteln Mischungslücken vermindern; dadurch kann zusätzlich die Mischbarkeit der Bestandteile unterstützt werden.

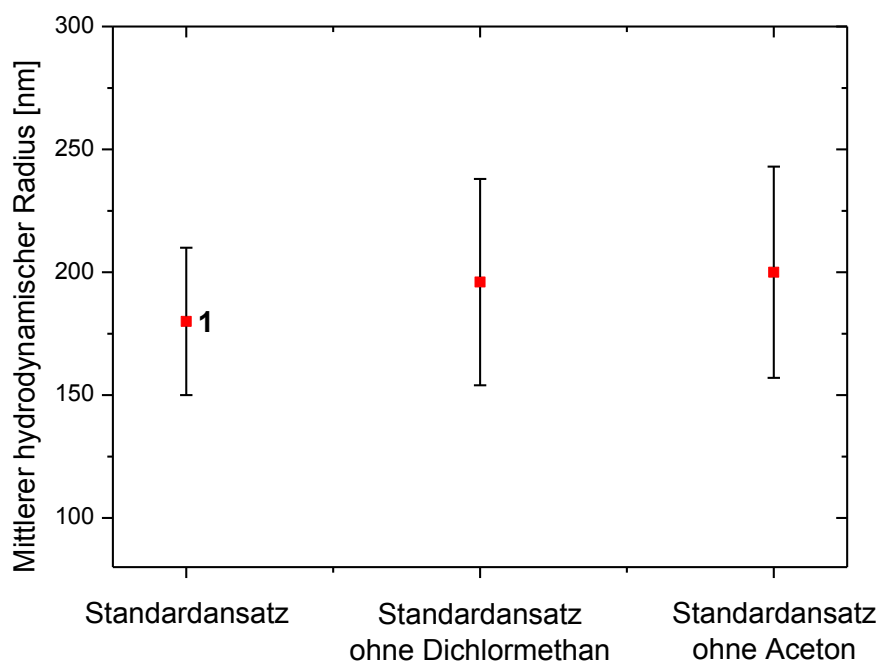


Abb. 52: Mittlere hydrodynamische Radien, die aus der Variation des Lösungsmittelgemisches resultieren.

5.2.4 Tensidreduzierte Kapselpräparationen

Desgleichen ist für den medizinischen Einsatz notwendig, dass die hergestellten Dispersionen entweder wenig oder gar kein Tensid für die geringste mögliche Toxizität beinhalten. In diesem Sinne wurde basierend auf der Standardsynthese die Menge des eingesetzten Tensids Synperonic® PE/F68 sukzessive verringert. Die Kapselgrößen und das Agglomerationsverhalten der Kapseln wurden untersucht, um die Wirkung der herausgestellten Tensidkonzentration auf die Nanokapselbildung oder -stabilisierung zu belegen. Deswegen wurde die Menge an Tensid in der wässrigen Phase von der Originalmenge von 0,10 g (s. Standardsynthese in Kap. 3.1) in Stufen von 75 %, 50 %, 25 % und 12,5 % verkleinert, während die Tensidmenge in der organischen Phase konstant beibehalten wurde. Synthesen komplett ohne Tenside wurden ebenfalls durchgeführt, aber die resultierenden Dispersionen sind für das *Particle Tracking* ungeeignet. Dies begründet sich u.a. in der Zugabe von 5 Gew.-%iger Magnesium(II)chlorid Hexahydrat-Lösung (s. Kap. 3.4), die letztlich zur endgültigen Destabilisierung der metastabilen Nanokapseldispersen führt. Für das ζ -Potential der PnBCA-PFD-Nanopartikel sind leicht negative Werte erhalten

worden. Daher wird angenommen, dass die elektrostatische Stabilisierung neben der sterischen Stabilisierung einen signifikanten Anteil zur Stabilität der Nanokapseldispersion entrichtet (vgl. Abschnitt 2.4.1).

Eine andere Möglichkeit ist, dass der Unterschied in den Brechungsindizes zwischen den Kapselkernen und dem umgebenden Medium unterhalb eines kritischen Schwellenwertes der Dunkelfeldmikroskopie gelangt. Unter Berücksichtigung aller korrespondierenden Messungen beeinflussen längere Auslagerungszeiten natürlich die Kapseldispersionen hin zu verstärkter Polydispersität, die auf Agglomeration zurückgeführt wird.

Alle Dunkelfeldmessungen der tensidreduzierten Synthesen zeigen auf, dass kleinere Partikelradien als in der Standardsynthese entstehen (s. Abb. 53). Diese spezielle Beobachtung könnte erklärt werden, indem die oberflächenaktive Natur der Tenside betrachtet wird. Physikalisch gesehen minimieren Tenside die Oberflächenspannung, was bedeuten kann, dass größere PFD-Matrices aus der übersättigten PFD-Lösung nukleieren. Chemisch gesehen kann die Anwesenheit von Tensid an den Grenzflächen verhindern, dass die Monomere sich während der Kapselbildung nicht schnell genug anordnen können (Absenkung der „aktiven Grenzflächenkonzentration“), wodurch dem System mehr Zeit bleibt größere Matrices zu generieren. Auch eine Kombination beider Phänomene ist nicht unwahrscheinlich. Eine möglicherweise erhöhte Nanosphärenbildung kann ebenfalls in Betracht gezogen werden, jedoch müssten dabei die zugehörigen Standardabweichungen (s. Fehlerbalken in Abb. 53) signifikant größer ausfallen als gemessen und daher wird diese Möglichkeit ausgeschlossen. Außerdem ist denkbar, dass diese Beobachtungen verwendet werden können, um spezifische Nanokapselgrößen herzustellen. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass kleinere Nanokapseln nur geringere Mengen an molekularem Sauerstoff transportieren können.

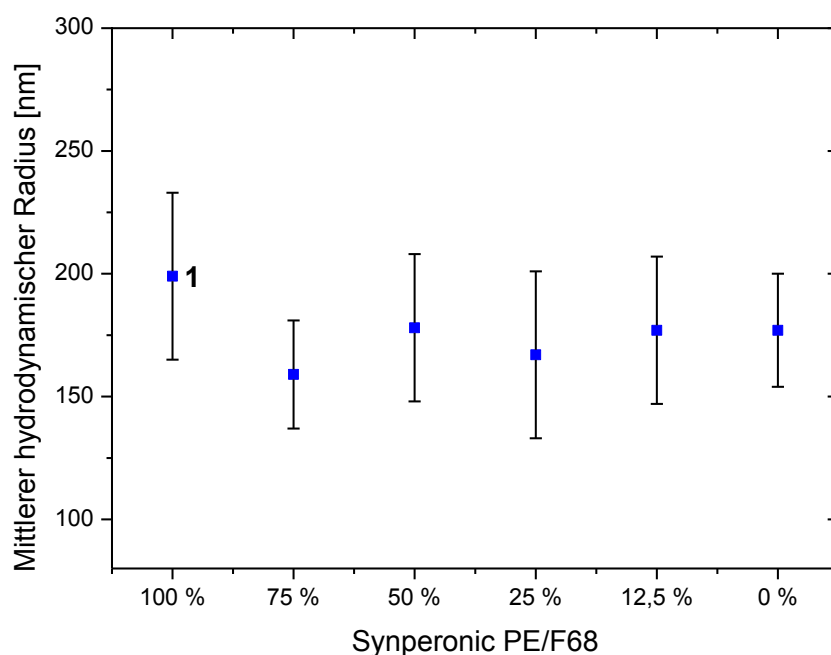


Abb. 53: Mittlere hydrodynamische Radien von P_nBCA-PFD-Nanokapseldispersionen beim Einsatz unterschiedlicher Tensidkonzentrationen prozentual von der wässrigen Phase des Standardansatzes.

5.2.5 Kapselpräparationen mit Tensiden unterschiedlicher Kettenlänge

Um die Wirkung des Synperonic[®] PE/F68 auf die Nanokapselbildung zu prüfen, werden andere Tenside benötigt, die in der gleichen Weise in der Synthese verwendet wurden. Diese Variation wird in diesem Unterkapitel gezeigt und ebenso wird der Einfluss der Tenside mit unterschiedlichen Kettenlängen in der Synthese diskutiert.

Dazu wurden die sterisch stabilisierenden Tenside Lutrol[®] L44, F68, F87 und F108 verwendet. Die Synperonic[®]- und Lutrol[®]-Tenside bestehen prinzipiell aus den gleichen amphiphilen Block-Copolymeren (Ethylen- und Propylenoxid) und die Zahl F-XY gibt indirekt ihre Kettenlängen wieder. Synperonic[®] PE/F68 und Lutrol[®] F68 haben die gleiche Kettenlänge, aber sie werden von unterschiedlichen Herstellern produziert, deswegen könnten sie leicht unterschiedliche Zusammensetzungen bezüglich ihrer Monomere sowie auch unterschiedliche Kettenlängenverteilungen oder Verunreinigungen besitzen. Die unterschiedlichen Tenside, die in diesen Untersuchungen enthalten sind, werden in gleichen absoluten Massen hinsichtlich des Synperonic[®] PE/F68 in der Standardsynthese verwendet.

Nachfolgend ist in Abb. 54 die Wirkung des Tensidaustausches auf die Nanokapselgrößen und das Agglomerationsverhalten dargestellt.

Die Charakterisierungen demonstrieren, dass keine signifikante Wirkung aus den Kettenlängen auf die Nanokapselgrößen innerhalb der Lutrol[®]-Tensidreihe geschlussfolgert werden kann. Die Kapselgrößen unterscheiden sich allerdings zwischen den Synperonic[®]- und Lutrol[®]-Tensiden und ergeben ähnliche Zusammenhänge wie bei der Tensidreduktion (s.o.). Aufgrund mangelnder Spezifikationen, kann die Ursache hierfür nicht erörtert werden. Das Agglomerationsverhalten der Lutrol[®]-stabilisierten Nanokapseln (Abb. 65) ist jedoch ähnlich zu den Nanokapselsystemen mit Synperonic[®] PE/F68. Möglicherweise können leicht geringere Partikelgrößen durch Verwendung von Lutrol[®] anstelle von Synperonic[®] erreicht werden.

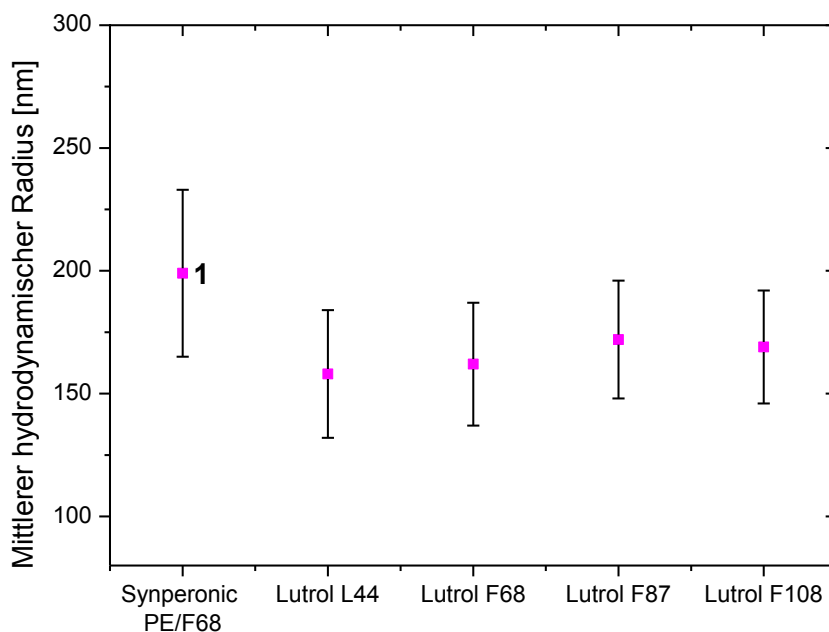


Abb. 54: Mittlere hydrodynamische Radien von *Pn*BCA-PFD-Nanokapseldispersionen beim Einsatz von unterschiedlichen Tensiden.

5.2.6 Variation der Synthesetemperatur

Der Einfluss der Temperatur auf die Nanokapselbildung und die Größenverteilung wurde ebenfalls untersucht. Dazu wurde die wässrige Phase auf 5 °C, 23 °C, 30 °C und 40 °C ($\pm 0,5$ °C) temperiert, wohingegen die Temperatur der organischen Phase konstant bei einer Raumtemperatur von ungefähr 23 °C beibehalten wurde. Experimente mit noch höheren Temperaturen wurden nicht durchgeführt, um hohe Agglomerationsraten oder Verdampfungseffekte der organischen Phase auszuschließen, die etwaige Tendenzen maskieren könnten. Die gemessenen Größenverteilungen der Dispersionen werden in Abb. 55 zusammengefasst. Die aus den Experimenten erhaltenen Nanokapseldispersionen mit Temperaturen bei Raumtemperatur oder höher (23-40 °C) haben relativ ähnliche Größenverteilungen. Des Weiteren weisen die Messungen der Nanokapseln, die bei 23 °C, 30 °C und 40 °C synthetisiert wurden, ähnliche hydrodynamische Radien von jeweils 180 ± 30 nm, 192 ± 23 nm und 193 ± 31 nm auf. Im Gegensatz dazu führt das Experiment bei 5 °C zu einer Dispersion mit einem mittleren hydrodynamischen Partikelradius von 135 ± 30 nm. Man könnte in diesem Fall auf eine bevorzugte Nanosphärenbildung schließen, aber der Grund für diese Beobachtung kann hier nicht eindeutig geklärt werden. Jedoch ist in diesem Histogramm keine Bimodalität erkennbar und die Verteilungsbreite bleibt ebenfalls unverändert. Beide Indizien lassen vermuten, dass es sich bei diesen Partikeln lediglich um kleinere Varianten der Nanokapseln handelt. Wahrscheinlich sorgt hier die geringere Löslichkeit des PFD für eine schnellere Übersättigung. Allerdings wirkt sich der bei dieser Temperatur kleinere Diffusionskoeffizient negativ auf den Aufbau größerer Matrices aus, während die weniger stark durch die Temperatur veränderte Polymerisierungsreaktion synchron abläuft.

Die Agglomeration ist bei erhöhter Temperatur vermutlich begünstigt, da die Brownsche Molekularbewegung und somit der Diffusionskoeffizient der Nanopartikel zunehmen und ergo die Nanopartikelzusammenstöße^[194]. Daher werden bei höheren Temperaturen auch leicht größere Partikelradien beobachtet. Ähnliche Zusammenhänge könnten bei Temperaturerniedrigung hierbei invers auch zutreffen, jedoch könnte die mit der Temperatur exponentiell steigende Reaktionsgeschwindigkeit diesen Effekt ausgleichen.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass sowohl die temperaturabhängigen Reaktionsgeschwindigkeiten und Wasserlöslichkeiten, als auch die Diffusionskoeffizienten der unterschiedlichen Komponenten in diesem System eine wichtige Rolle spielen.

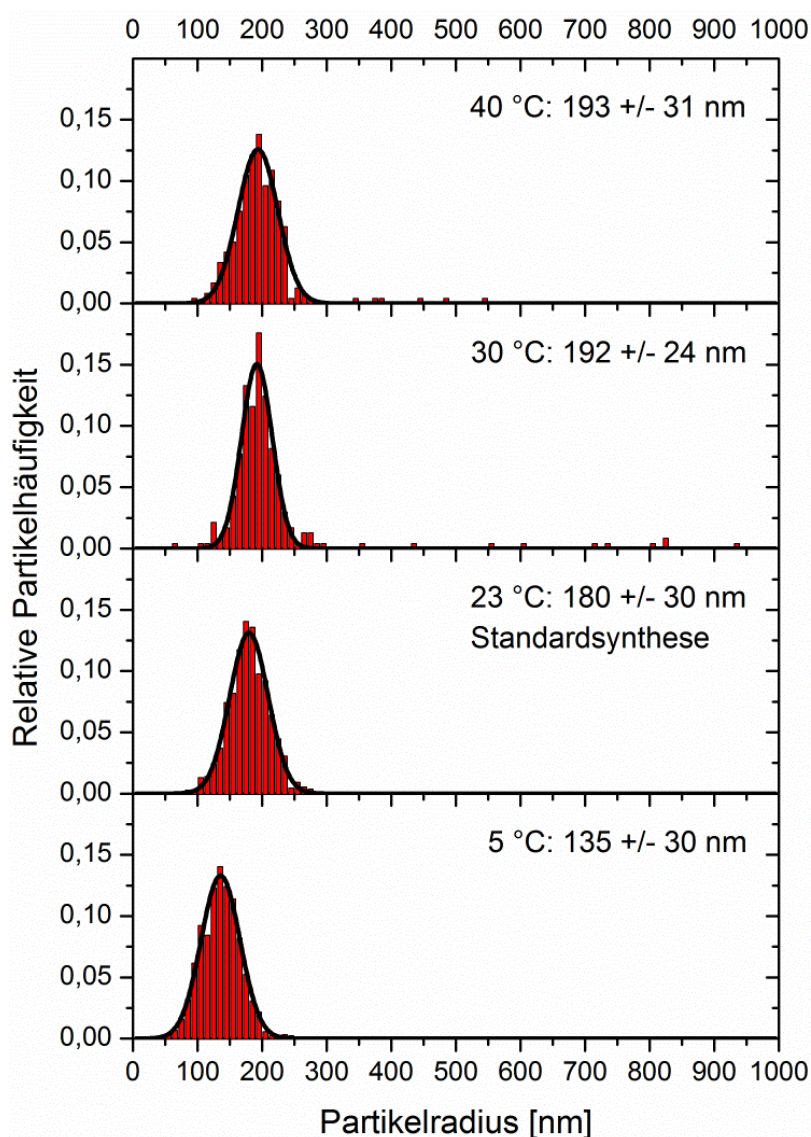


Abb. 55: Relative Größenverteilungen von PnBCA-PFD-Nanopartikeldispersionen bei unterschiedlichen Synthesetemperaturen.

5.3 Maßstabsvergrößerung der PnBCA-PFD-Nanokapseldispersion

Aufgrund des Bedarfs größerer Mengen an PnBCA-PFD-Nanokapseln im Hinblick auf Rattenleberperfusionen und intravenöse Infusionen wurden halbindustrielle Ansätze hergestellt.

Die Nanokapselgrößenverteilungen vom Standardansatz und von den 10-, 20- und 40-fach hochskalierten Ansätzen sind in Abb. 43, Abb. 56, Abb. 57 und Abb. 58 dargestellt. Die charakteristischen Histogramme zeigen, dass die Kapselgrößenverteilungen relativ monodispers sind und für die Mehrheit der Kapseln eine Radienbreite von ungefähr 100 bis 300 nm aufweisen, sowie hohe Bestimmtheitsmaße um etwa 0,99 bezogen auf die Gauß-Anpassung besitzen.

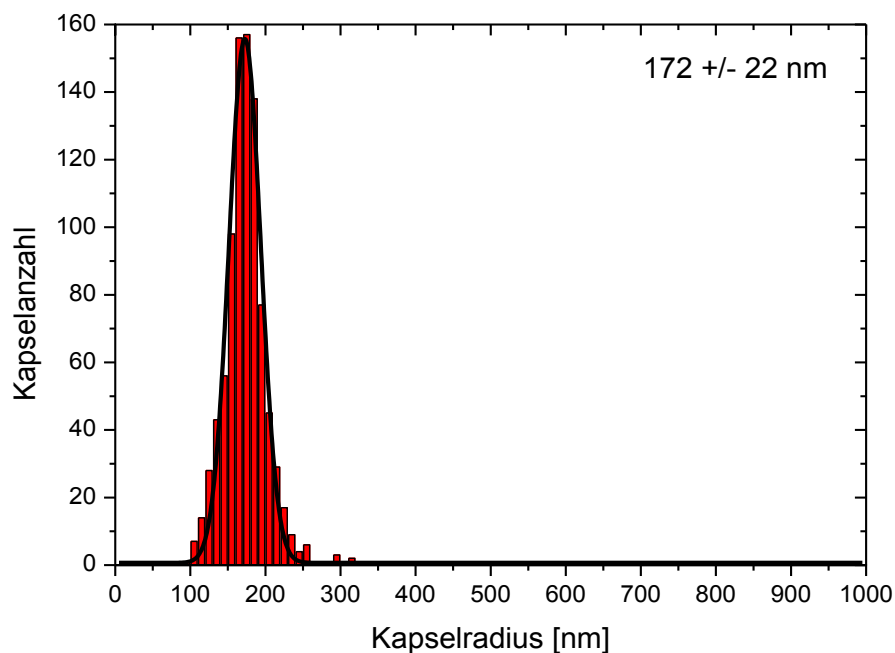


Abb. 56: Größenverteilung von einem 10-fach hochskalierten PnBCA-PFD-Nanokapsel-Ansatz.

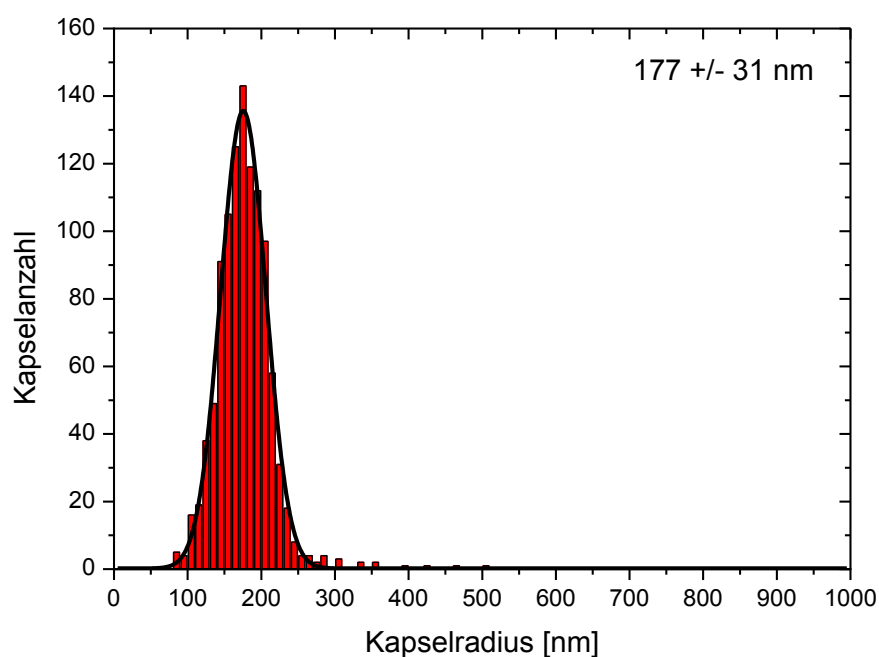


Abb. 57: Größenverteilung von einem 20-fach hochskalierten PnBCA-PFD-Nanokapsel-Ansatz.

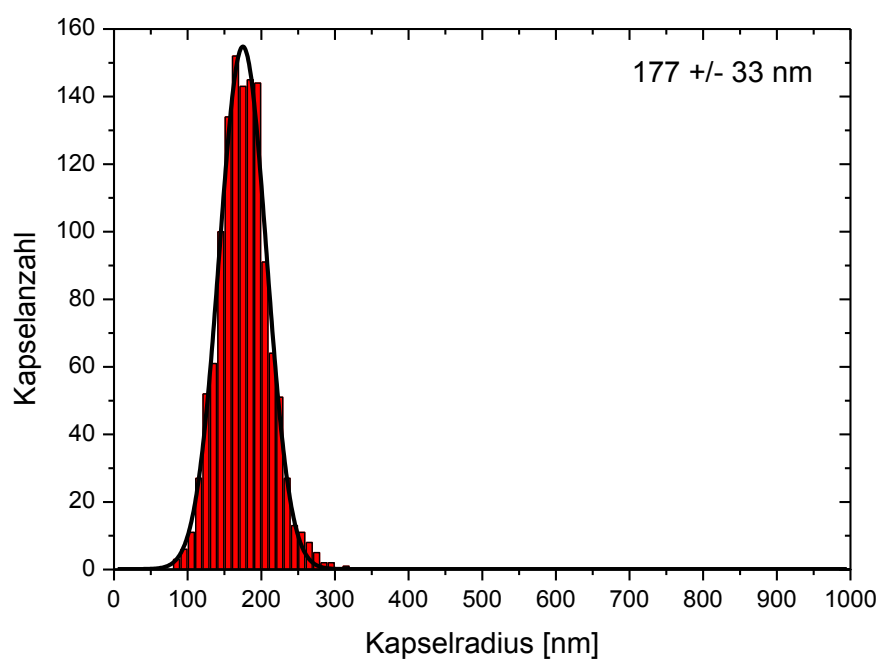


Abb. 58: Größenverteilung von einem 40-fach hochskalierten PnBCA-PFD-Nanokapsel-Ansatz.

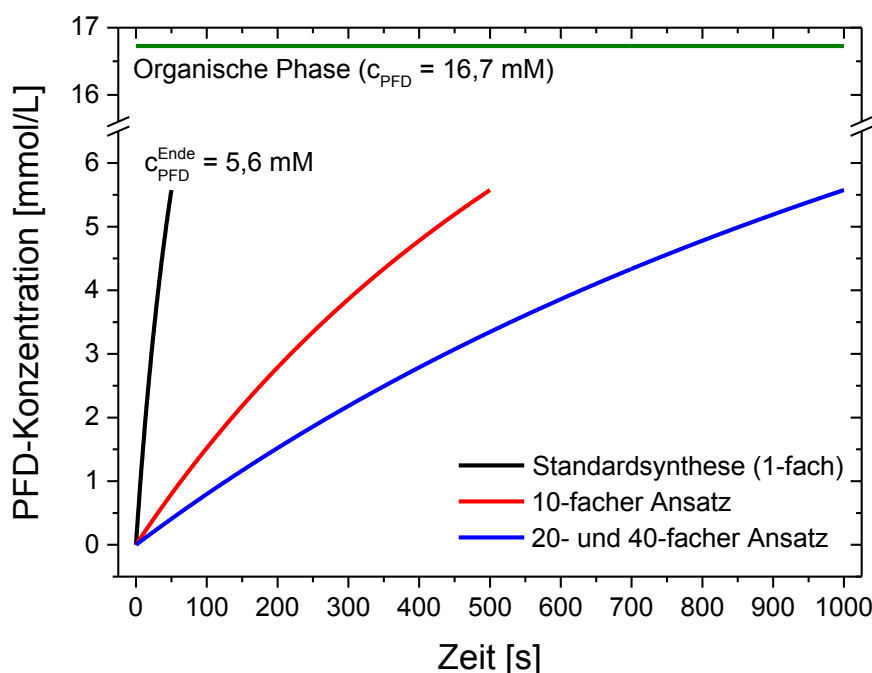


Abb. 59: Theoretisches PFD-Konzentrations-Zeit-Profil unterschiedlicher Ansatzgrößen.

Anhand von Abb. 59 wird das zeitliche PFD-Konzentrationsprofil der maßstabsvergrößerten Ansätze vergleichsweise zur Standardsynthese zeitabhängig veranschaulicht, bei der ein konstanter Volumenstrom (vgl. Abb. 12) angenommen wurde.

Die Konzentration des PFD steigt beim Standardansatz schneller an als bei den hochskalierten Ansätzen. Ein geringes Volumen an PFD pro Zeit wird in ein sehr großes Wasservolumen eingebracht, wodurch sich die Konzentration nur langsam vergrößert. Bei den 20- und 40-fachen Ansätzen fallen die Kurven wegen der doppelten Zulaufgeschwindigkeit beim 40-fachen Ansatz zusammen.

Aufgrund der Hochskalierung der *Pn*BCA-PFD-Nanokapseln kann viel länger in einem Konzentrationsbereich synthetisiert werden, der einen optimalen Ouzo-Effekt garantiert. Daher wurden marginal monodispersere Größenverteilungen bei den hochskalierten Ansätzen bestimmt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zulaufgeschwindigkeit noch weiter optimiert werden könnte. Es gilt hierbei einen Kompromiss zwischen der Homogenität der Lösung, die Einfluss auf den Ouzo-Effekt hat, und der möglichen Degradation der Kapselwände durch vorhandene Lösungsmittel bei vertretbarem experimentellem Zeitaufwand zu finden. Außerdem besteht die Gefahr, dass bei zu langer Zulaufgeschwindigkeit eine Polymerisation des Monomers durch Luftfeuchtigkeit bereits vor der Zugabe im Tropftrichter stattfindet.

5.4 Langzeitstabilität der PnBCA-PFD-Nanokapseldispersionen

Die hydrodynamischen Radien der Langzeitstabilitätsuntersuchungen der Dispersionen mit variierten Molenbrüchen in der organischen Phase (x_0) sind in Abb. 60 dargestellt:

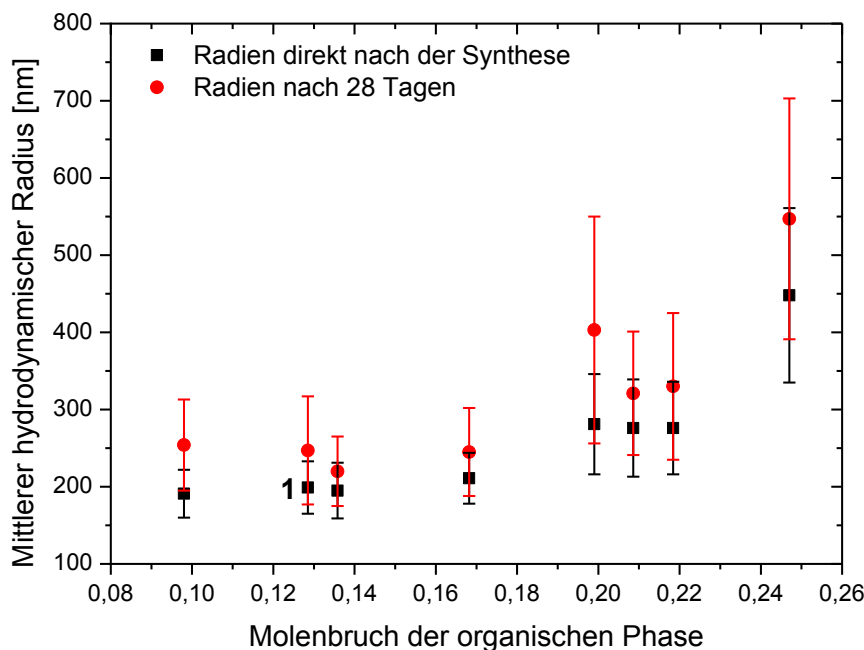


Abb. 60: Mittlere hydrodynamische Radien bei unterschiedlichen Molenbrüchen der organischen Phase während des Langzeitstabilitätstests.

Die Ergebnisse präsentieren eine zwar verbesserungsfähige, aber dennoch akzeptable Alterungsbeständigkeit hinsichtlich des Entwicklungsstatus dieser Kapselsysteme als künstliche Sauerstoffträger. Im Detail zeigt sich dabei, dass sowohl die gemessenen Partikelradien als auch die Verteilungsbreiten nach einer Zeitspanne von vier Wochen deutlich größer sind. Es wird also eine Agglomeration bei allen Ansätzen beobachtet, die umso ausgeprägter erscheint, je mehr der Molenbruch der organischen Phase von dem der Standardsynthese abweicht. Die Vergrößerung der mittleren Radien liegt zwischen 25-122 nm. Proben mit einem deutlich größeren mittleren hydrodynamischen Radius besitzen ebenfalls eine größere Abweichung nach vier Wochen, was in ihrem speziellen Agglomerationsverhalten begründet sein kann. Auch wenn kleinere Partikel eine höhere Kollisionsfrequenz aufweisen und dadurch eine schnellere Agglomeration begünstigen, kann hier kein eindeutiger Trend fixiert werden, da zu viele kinetisch wichtige Parameter unbekannt sind. Wenn jedoch zwei Partikel unelastisch kollidieren, so würde dies bei der

Agglomeration größerer Partikel zu einer größeren relativen Zunahme des hydrodynamischen Radius führen als bei kleineren Partikeln. Dieses Phänomen müsste dann noch mit der Kollisionsfrequenz und insbesondere mit der Agglomerationseffizienz skaliert werden, die stark abhängig vom Funktionalisierungs- bzw. Stabilisierungszustand und damit auch vom Partikelradius sein kann. Da die Ursache für den Trend hin zu größeren Radien bei steigendem x_0 nicht genau bekannt ist (vgl. Kap. 5.2.1.1), kann hier lediglich ein Effekt der Lösungsmittel auf die Agglomerationsgeschwindigkeit diskutiert werden, der entweder während oder kurz nach der Synthese bis zum Entfernen der Lösungsmittel auftritt. In diesem Sinne könnte eine größere auf den Kapseloberflächen adsorbierte Menge Lösungsmittel dafür sorgen, dass sich das Tensid weniger ausgeprägt in der Lösung entfaltet und dadurch die sterische Stabilisierung vermindert. Auch ein Effekt auf die Struktur oder Integrität der Kapselwände, die ebenfalls die Agglomerationsgeschwindigkeit verändern können, wäre denkbar. Nicht ganz auszuschließen wäre auch ein Quellen der Partikel, das ausgeprägter verläuft, je nach eingesetzter Lösungsmittelmenge.

Langzeitstabilitätstests der Nanokapseldispersionen bei Variation des PFD-Anteils bei konstanter Monomermenge werden fortlaufend als „monomerunangepasst“ bezeichnet. Diese Synthesen wurden ebenso wie die Standardsynthese durchgeführt und ihre Partikel wurden unmittelbar nach der Synthese verfolgt, sowie nach 14, 28 und 42 Tagen der Lagerung bei $4 \pm 0,5$ °C (Abb. 61).

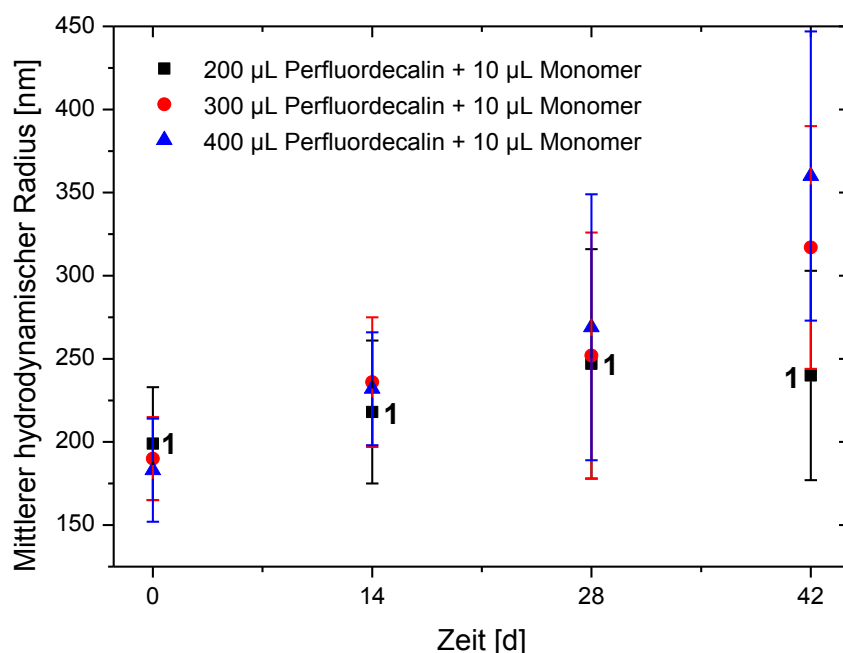


Abb. 61: Mittlere hydrodynamische Radien bei ansteigendem Perfluorodecalin-Anteil und unangepasster Monomermenge während des Langzeitstabilitätstests.

Nach sechs Wochen Lagerungszeit sind eine Verbreiterung der Größenverteilung und ein Anstieg der mittleren hydrodynamischen Radien und Standardabweichungen unverkennbar. Der mittlere hydrodynamische Radius für den Ansatz mit 200 µL PFD steigt innerhalb von sechs Wochen von 199 ± 34 nm auf 240 ± 63 nm. Für die Ansätze mit 300 µL und 400 µL PFD sind nach diesem Zeitabschnitt die mittleren hydrodynamischen Radien signifikant von 190 ± 25 nm auf 317 ± 73 nm und von 183 ± 31 nm auf 360 ± 87 nm angewachsen. Es zeigt sich also, dass ein größerer verwendeter PFD-Anteil eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit in der Langzeitstabilität verursacht. Vermutlich werden bei den größeren PFD-Mengen die ohnehin dünnen Kapselwände so dünn, dass diese nach Polymerkettenumlagerung eine Koaleszenz in einem größeren Zeitintervall ermöglichen.

Die Langzeitstabilitätsmessungen sind gleichermaßen bei den monomerangepassten Variationen durchgeführt worden (Abb. 62):

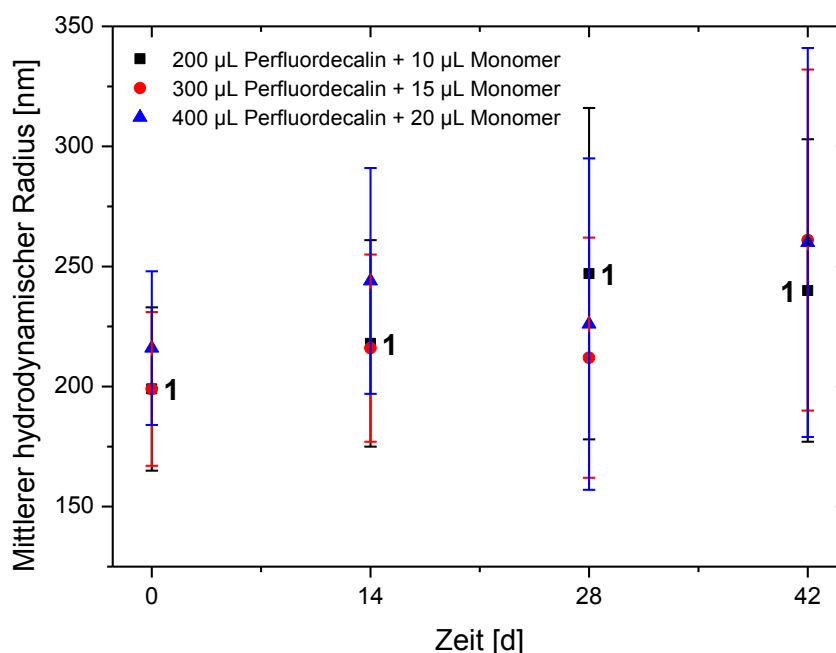


Abb. 62: Mittlere hydrodynamische Radien bei ansteigendem Perfluorodecalin-Anteil und angepasster Monomermenge während des Langzeitstabilitätstests.

Ähnliche Tendenzen der Dispersionscharakteristika wurden wie bei den monomerunangepassten Synthesen festgestellt, allerdings mit dem Unterschied, dass der individuelle Trend nicht mehr so stark von der eingesetzten PFD-Menge abhängt. Dies bekräftigt die Vermutung einer Koaleszenz von Kapseln mit dünneren Wänden, da diese eine Umlagerung wahrscheinlicher macht. Der mittlere hydrodynamische Radius für die Probe mit 200 µL PFD steigt hier innerhalb von sechs Wochen von 199 ± 34 nm auf 240 ± 63 nm an. Bei den Proben mit 300 µL PFD wachsen die Kapselgrößen von 199 ± 32 nm auf 261 ± 71 nm und für die eingesetzten 400 µL PFD von 216 ± 32 nm auf 260 ± 81 nm. Insgesamt variieren die Nanokapselgrößen also nicht so stark wie bei den monomerunangepassten Experimenten. Des Weiteren wurde auch die Langzeitstabilität von den Ansätzen ohne Dichlormethan und Aceton beobachtet (Abb. 63):

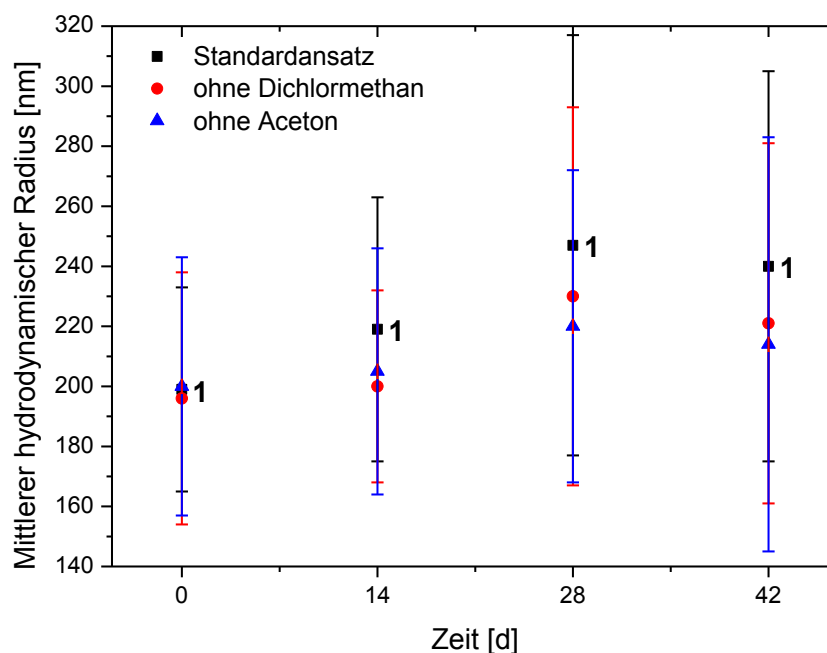


Abb. 63: Mittlere hydrodynamische Radien während des Langzeitstabilitätstests bei Variation des Lösungsmittelgemisches.

Die Ergebnisse hierbei demonstrieren, dass die um die beiden Lösungsmittel reduzierten Ansätze sogar eine deutlich bessere Langzeitstabilität aufweisen. Anscheinend macht sich hier der bereits oben angedeutete Einfluss auf die Struktur/Integrität der Kapselwände bemerkbar. Ein Verzicht auf diese potentiell toxischeren Lösungsmittel wäre also auch unter diesem Aspekt möglich.

Nachfolgend sind auch die Langzeitstabilitäten der tensidvariieren Ansätze untersucht worden (Abb. 64 und Abb. 65). Aus diesen Experimenten geht hervor, dass sich die Alterungsverhalten nicht signifikant vom Standardansatz unterscheiden (ähnliche Steigungen). Erstaunlich ist das bereits weiter oben thematisierte Resultat der durchweg kleineren Partikelgrößen bei gleichbleibender Stabilität. Die Kapselhüllen scheinen also selbst für ihre Stabilität verantwortlich zu sein. Dies kann einerseits durch das Exponieren der negativen Partialladungen der Cyanogruppen erklärt werden, was auch mit dem leicht negativem ζ -Potential konsistent ist. Andererseits kann dies durch Hineinragen von polymerisierten Monomerketten in die Lösung geschehen, die an Fehlstellen oder nur einseitig an Kapseln assoziiert sind. In Summe wäre sogar eine Kombination dieser elektrostatischen und sterischen Stabilisierung vorstellbar.

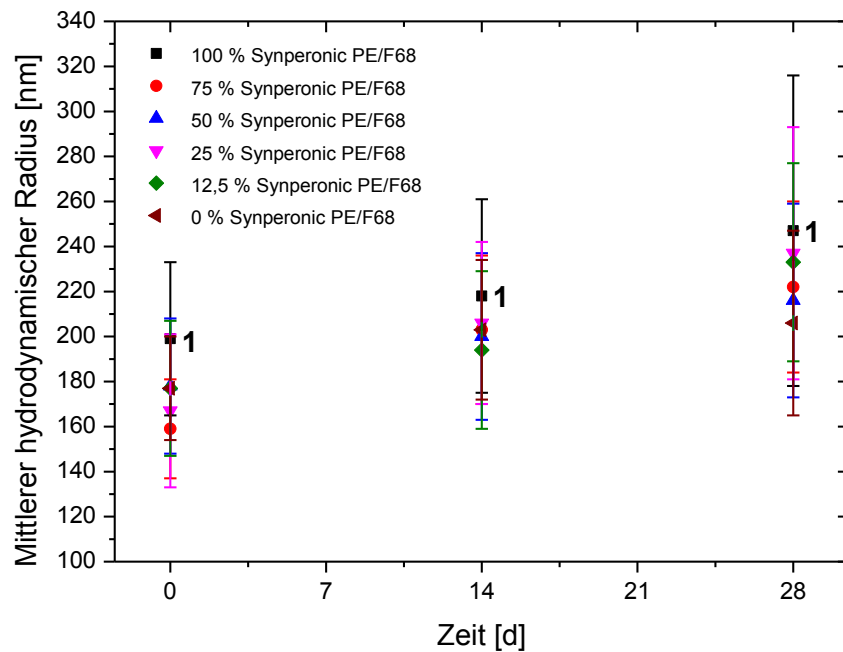


Abb. 64: Mittlere hydrodynamische Radien tensid-reduzierter *PnBCA*-PFD-Nanokapsel-dispersionen während des Langzeitstabilitätstests.

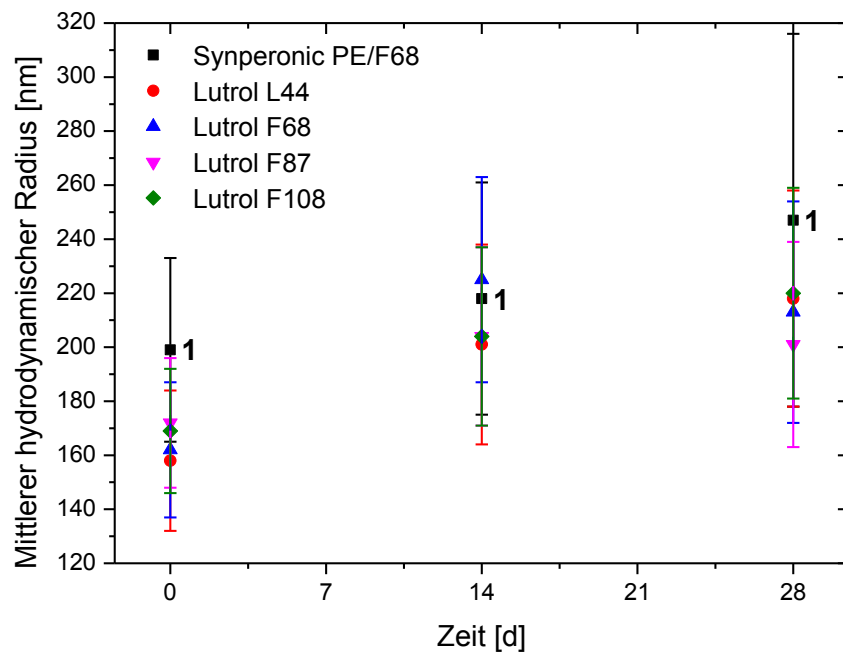


Abb. 65: Mittlere hydrodynamische Radien tensid-ausgetauschter *PnBCA*-PFD-Nanokapseldispersionen während des Langzeitstabilitätstests.

Die Langzeitstabilität der PnBCA-PFD-Nanokapseldispersionen der 10-, 20- und 40-fach hochskalierten Ansätze wurden ebenfalls vergleichend zum Standardansatz analysiert (s. Abb. 66, Abb. 67, Abb. 69 und Abb. 70). Die Ergebnisse der Langzeitstabilitätsuntersuchungen sind sich hinsichtlich Agglomerationsgeschwindigkeit und Verteilungsbreiten relativ ähnlich in den entsprechenden Bewertungszeiträumen. Anfänglich besitzen die Proben von diesen vier Dispersionen mittlere hydrodynamische Radien von 199 ± 34 nm (Standardansatz), 172 ± 22 nm (10-fach hochskalierter Ansatz), 177 ± 31 nm (20-fach hochskalierter Ansatz) und 177 ± 33 nm (40-fach hochskalierter Ansatz). Währenddessen steigen im Lagerungszeitraum von 56 Tagen die mittleren hydrodynamischen Radien, die Standardabweichungen und die Polydispersität leicht, aber allmählich an. Zwei Prozesse bestimmen wahrscheinlich das Alterungsverhalten der Dispersion: die Agglomeration und die Quellung der Nanokapseln. Nach 56 Tagen der Lagerung werden mittlere hydrodynamische Radien von 268 ± 75 nm (Standardansatz), 306 ± 78 nm (10-fach hochskalierter Ansatz), 272 ± 67 nm (20-fach hochskalierter Ansatz) und 265 ± 64 nm (40-fach hochskalierter Ansatz) erhalten. Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass die Nanokapselansätze hinsichtlich ihrer Größenverteilungen in einem Beobachtungszeitraum von acht Wochen unter kühlen Lagerungsbedingungen moderat langzeitstabil sind (Abb. 71).

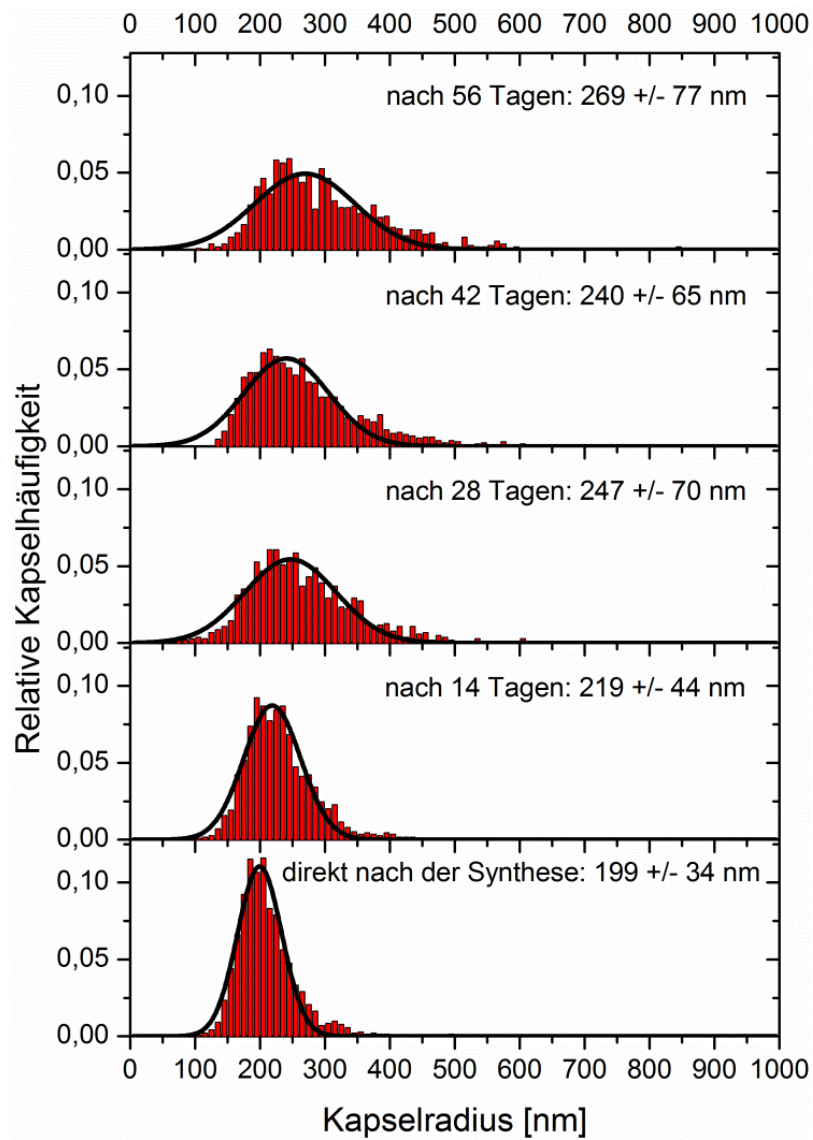


Abb. 66: Relative Größenverteilungen von einem PnBCA-PFD-Nanokapsel-Standardansatz in chronologischer Sequenz der durchgeführten Langzeitstabilitätsuntersuchung.

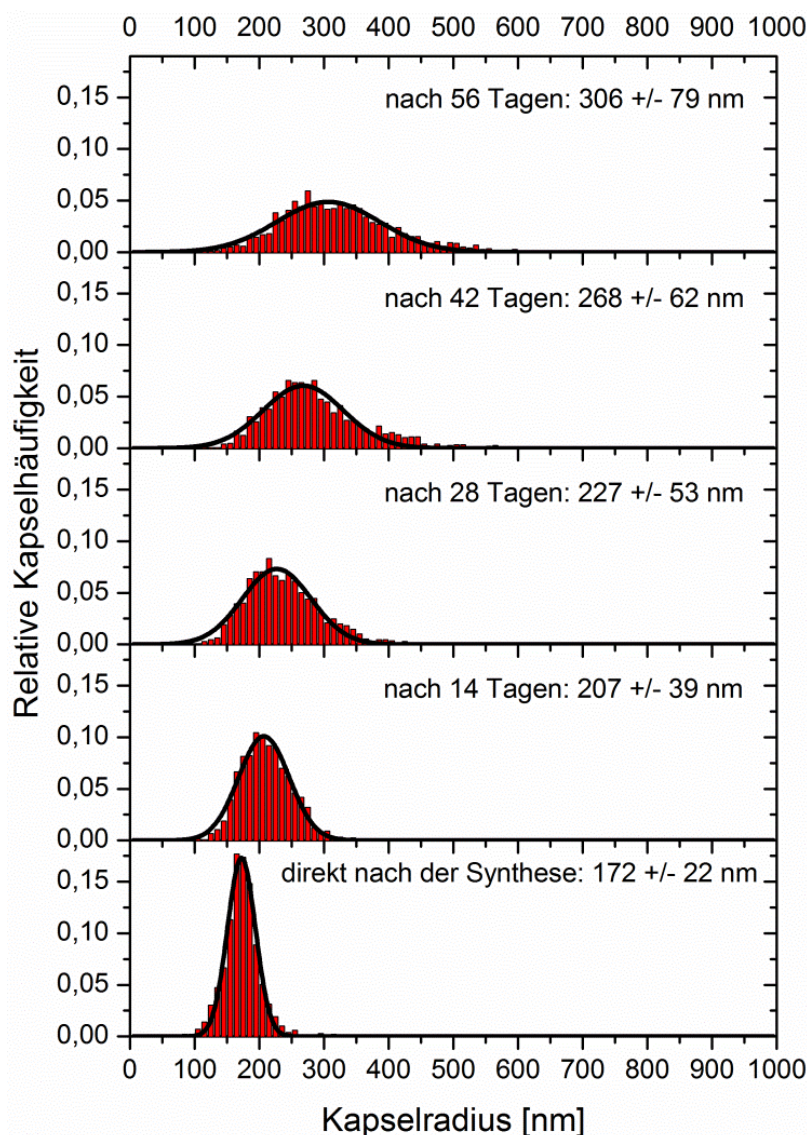


Abb. 67: Relative Größenverteilungen von einem 10-fach hochskalierten PnBCA-PFD-Nanokapsel-Ansatz in chronologischer Sequenz der durchgeführten Langzeitstabilitätsuntersuchung.

Eine beschleunigte Langzeitstabilitätsuntersuchung wurde anhand eines 10-fach hochskalierten PnBCA-PFD-Nanokapsel-Ansatzes durchgeführt (Abb. 68). Dieser Langzeitstabilitätsbelastungstest wurde bei 60 °C im Trockenschrank anstelle der Lagerung im Kühlschrank bei etwa 4 °C durchgeführt. Wie schon in Kap. 5.2.6 (Synthese bei unterschiedlichen Temperaturen) erwähnt, ist die Agglomeration bei Temperaturerhöhung begünstigt, da die Brownsche Molekularbewegung und somit der Diffusionskoeffizient der Nanopartikel zunehmen und ergo die Nanopartikelzusammenstöße^[194]. Die perikinetische Agglomeration ist gegenwärtig.

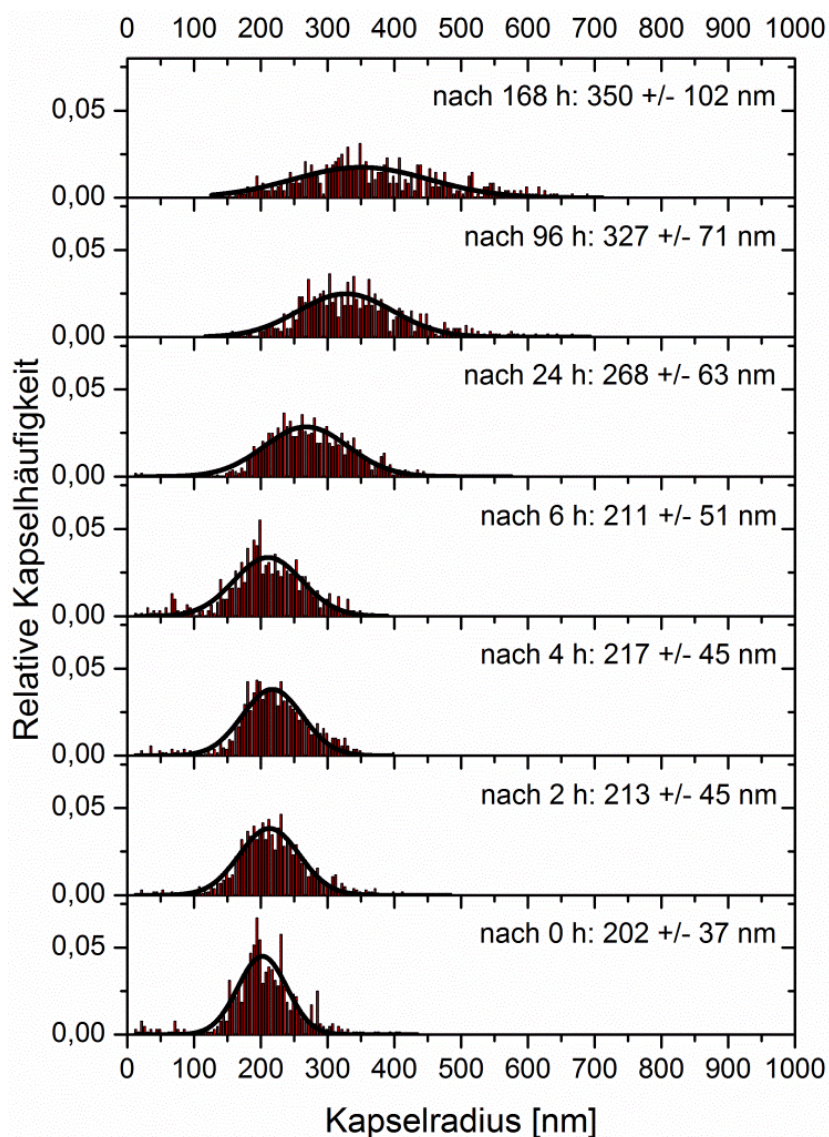


Abb. 68: Relative Größenverteilungen⁷ von einem 10-fach hochskalierten PnBCA-PFD-Nanokapsel-Ansatz in chronologischer Sequenz der Langzeitstabilitätsuntersuchung bei 60 °C.

⁷ Das erste im Arbeitskreis etablierte *Nanoparticle Tracking (Dynamic Nanosizing Microscopy, DNM)* wurde für diese Untersuchung verwendet.

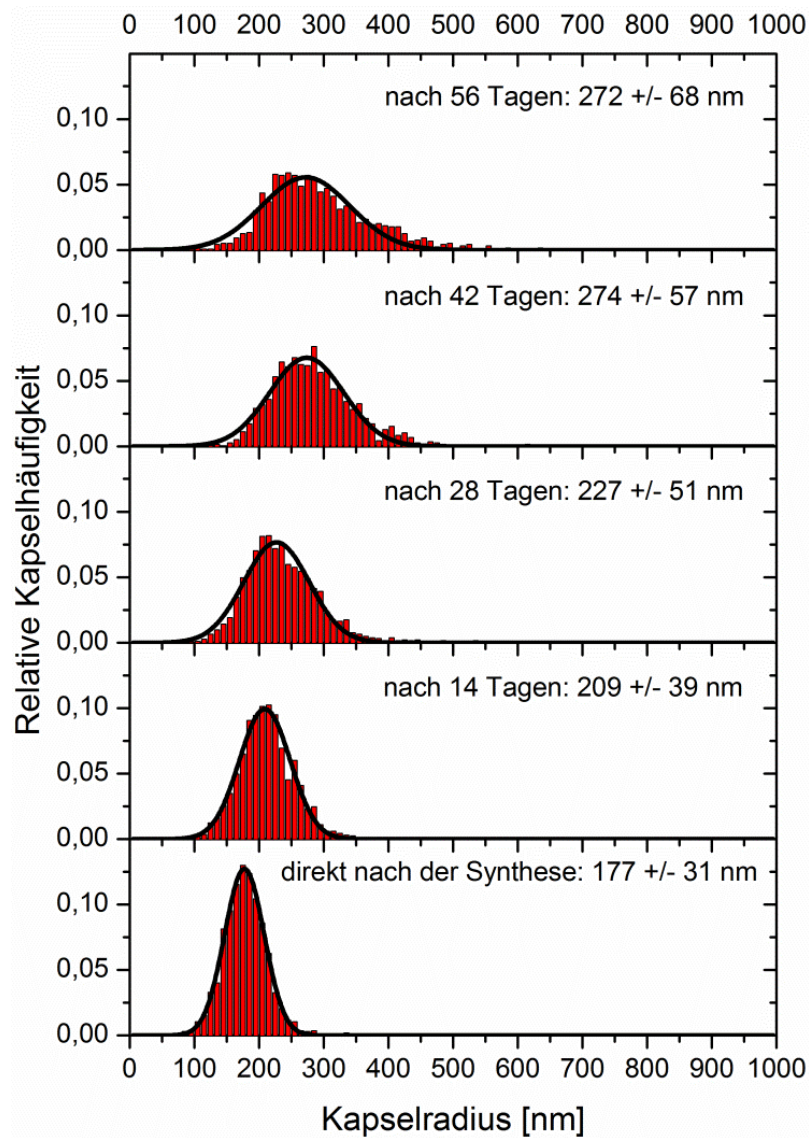


Abb. 69: Relative Größenverteilungen von einem 20-fach hochskalierten PnBCA-PFD-Nanokapsel-Ansatz in chronologischer Sequenz der durchgeführten Langzeitstabilitätsuntersuchung.

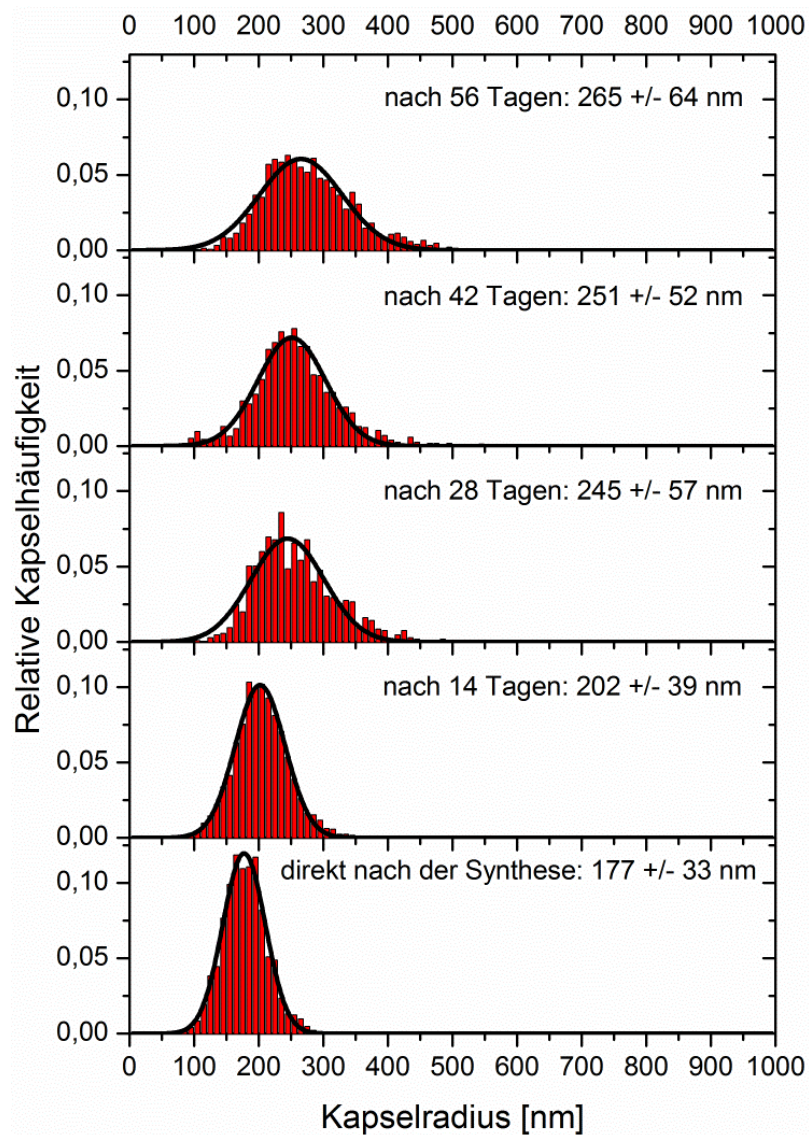


Abb. 70: Relative Größenverteilungen von einem 40-fach hochskalierten PnBCA-PFD-Nanokapsel-Ansatz in chronologischer Sequenz der durchgeführten Langzeitstabilitätsuntersuchung.

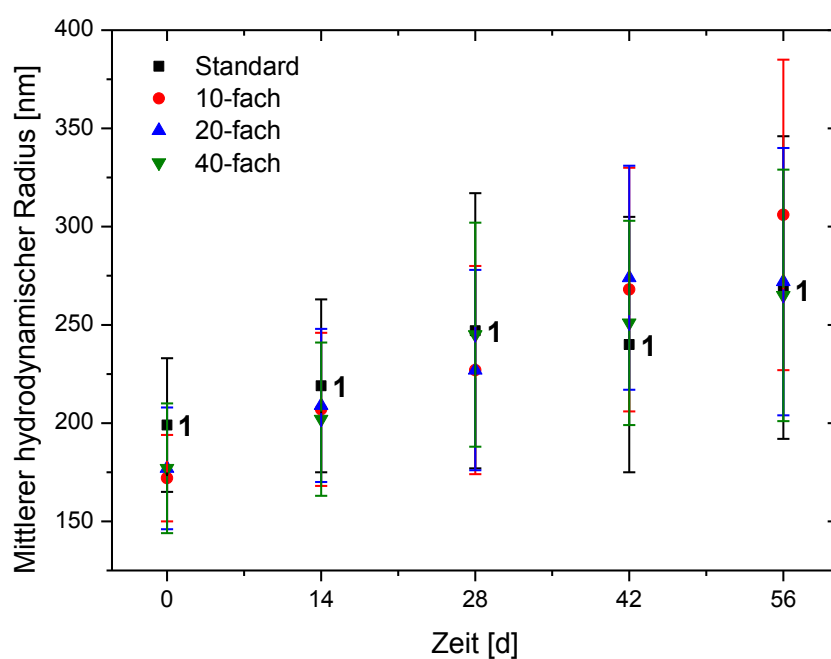


Abb. 71: Gegenüberstellung der Langzeitstabilität des Standardansatzes und der 10-, 20- und 40-fach hochskalierten Ansätze.

5.5 Verhalten in biologischer Umgebung

5.5.1 Viskosität

Um die Anwendbarkeit von PnBCA-PFD-Nanokapseldispersionen im Blutgefäßsystem zu gewährleisten, ist es wichtig die zugrunde liegenden rheologischen Eigenschaften des Systems zu kennen. Die dynamischen Viskositäten bei 37 °C von verschiedenen Verdünnungen der Nanokapseldispersionen mit Krebs-Henseleit (KH)-Pufferlösung, wie sie auch für physiologische Experimente zum Einsatz kamen (vgl. Kap. 5.5.3), wurden mittels Ostwald-Viskosimetrie fünffach bestimmt (Abb. 72 und Tab. 5, S. 133):

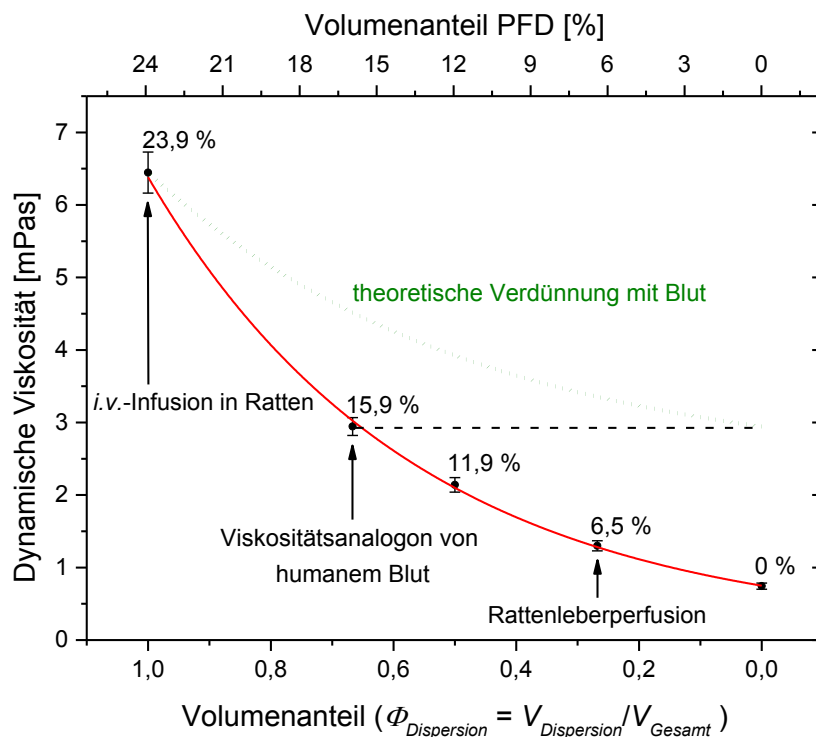


Abb. 72: Viskositätsbestimmungen mit dem Ostwald-Viskosimeter bei 37 °C der PnBCA-PFD-Nanokapseldispersion, verdünnt mit unterschiedlichen Volumina an KH-Puffer-Lösung (Verbindungslinien zur „Augenführung“).

Die Verdünnung, die bei Rattenleberperfusionsexperimenten verwendet wurde (Volumenverhältnis um etwa 0,27 von Kapseldispersion zu KH-Pufferlösung) ergibt eine dynamische Viskosität von ca. 1,3 mPas. Dieser relativ geringe Wert begünstigt die klinische Anwendung, weil die Blutzirkulation wahrscheinlich nicht behindert wird. Dadurch können mögliche Gewebeverschlüsse nach Kapselinfusion in den Blutstrom nicht auf lokale Erhöhungen in der Viskosität zurückgeführt werden. Der Volumenanteil der Dispersion

$\Phi_{Dispersion}$ von etwa $\frac{2}{3}$ resultiert in einer dynamischen Viskosität von ungefähr 3,0 mPas, welche mit menschlichem Blut (mit „Standard“-Hämatokritwerten von etwa 40 %^[282,355]) gut vergleichbar ist. Nach *Wells et al.*^[355] liegt die Viskosität für „normales“ humanes Vollblut bei etwa 3,5 mPas bei selbigem Hämatokritwert. Nach *Windberger et al.*^[282] liegt die dynamische Viskosität von Vollblut standardisierter Blutproben von Wistar-Ratten, die einen Hämatokrit von 43 %^[282,356] besitzen, leicht höher als beim Menschen, nämlich bei etwa 3,7 mPas. Die hämorheologischen Werte differieren zwischen den Säugetierspezies und besitzen somit ihren eigenen rheologischen Fingerabdruck^[282]. Das bedeutet auch, dass die native Blutviskosität der biologischen Spezies den Grenzwert für den maximal verwendbaren Volumenanteil an Kapseln vorgibt, d.h., dass die Viskosität zwar verändert aber keinesfalls vergrößert werden darf. Die theoretische Verdünnung konzentrierter Kapseldispersion mit Vollblut (vgl. grün-gepunktete Linie in Abb. 72) würde nämlich schnell zu einer Erhöhung der Viskosität führen, was die applizierbare Menge an Kapseln stärker einschränkt als die vorherige (optimale) Verdünnung ($\Phi_{Dispersion} \approx \frac{2}{3}$) mit KH-Puffer. Unter Vernachlässigung anderer physiologischer Effekte wäre die zur Blutviskosität äquivalente Verdünnung mit KH-Puffer jedoch unbegrenzt mit dem Blut mischbar, ohne die Viskosität des strömenden Mediums signifikant zu verändern. Die beobachtete Tendenz der gemessenen Werte (rote Volllinie) begründet sich wahrscheinlich in der Perkolation und Reibung zwischen den Kapseln^[171].

Die initialen Vorversuche der intravenösen Infusionen in Wistar-Ratten wurden mit konzentrierten PnBCA-PFD-Nanokapseldispersionen (ohne Verdünnung mit 0,9 %-iger physiologischer Kochsalzlösung) durchgeführt, um eine maximale O₂-Versorgung zu erzielen. Nachfolgend wurden intravenöse Applikationen unter vorheriger Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung realisiert, um eine Hämolyse *via* Osmose zu verhindern.

Die eingengte unverdünnte *i.v.*-applizierte PnBCA-PFD-Nanokapseldispersion besitzt eine dynamische Viskosität von ungefähr 6,5 mPas. Dieses artifizielle unverdünnte Erythrozytensubstitut hat, verglichen mit einem humanem allogenen Erythrozytenkonzentrat, etwa die halbe dynamische Viskosität, wenn von Erythrozytensuspensionen mit einem Hämatokrit von 80 % ausgegangen wird^[357,358].

Für die in Abb. 72 dargestellte Viskositätsbestimmung wurden Konzentrate aus zwei 40-fach hochskalierten Ansätzen mit einem Gesamtdispersionsvolumen von 67 mL verwendet, um genügend Volumen für alle Messungen inklusive Dichtebestimmungen bereit zu stellen, das in Summe 16 mL PFD beinhaltet. In diesem gesamten *cis*-, *trans*-PFD-Volumen, mit einer Sauerstofflöslichkeit bei 37 °C von 42 Vol.-%^[80,331], können im Gleichgewicht 6,72 mL

reiner Sauerstoff gelöst werden. Hingegen können *in vivo* unter Normaldruck in einem Gramm Hämoglobin 1,34 mL Sauerstoff gebunden werden, was der maximalen Sauerstoffbindungskapazität entspricht und als *Hüfner-Zahl*^[359] deklariert wird. Die theoretischen Vergleiche der O₂-Löslichkeiten sind in Tab. 5 zusammengefasst:

Tab. 5: Theoretische Vergleiche der maximalen Sauerstoffsättigungen der PnBCA-PFD-Nanokapseldispersion mit humanem Vollblut und einer Formulierung von einem Sauerstoffträger der zweiten Generation (*Oxygent*® AF0144). Die O₂-Sättigungen der Dispersionen wurden anhand des enthaltenen PFD-Volumens unter Zuhilfenahme der Sauerstofflöslichkeit von 42 Vol.-% (bei 37 °C)^[80,331] berechnet.

medizinische Applikation	Volumen- anteil $\Phi_{Dispersion}$	dynamische Viskosität	Volumen Dispersion	PFD- Volumen	maximale O ₂ -Sättigung (bezogen auf V_{PFD})
auf 100 mL Dispersion	1,00	6,45 mPas	100,0 mL	23,9 mL	10,04 mL
i.v.-Verabreichung	1,00	6,45 mPas	67,0 mL	16,0 mL	6,72 mL
Viskositätsanalogon	0,67	2,94 mPas	45,0 mL	10,7 mL	4,49 mL
	0,50	2,14 mPas	33,5 mL	8,0 mL	3,36 mL
Rattenleber- perfusion ^[353]	0,27	1,30 mPas	18,0 mL	4,3 mL	1,81 mL
mögliche medizinische Applikation			Volumen Vollblut		in vivo maximale O ₂ - Bindungskapazität im Hb unter Normaldruck
auf 100 mL Vollblut	~15 g Hb ^[360] , in vivo max. Bindung von 1,34 mL molekularem O ₂ in 1 g Hb (Hüfner-Zahl ^[359])		100,0 mL		20,10 mL
i.v.-Verabreichung	Volumina analog zur Dispersion:		67,0 mL	–	13,47 mL
Viskositätsanalogon			45,0 mL	–	9,05 mL
			33,5 mL	–	6,73 mL
Rattenleber- perfusion			18,0 mL	–	3,62 mL
nach J. G. Riess ^[37] , mit pO ₂ = 500 mmHg			Oxygent® AF0144 mit 32 Gew.-% PFC		~11 mL
			Blut mit einem Hkt. von 45 %		~21 mL

Die Messwerte der dynamischen Viskositätsbestimmungen aus Abb. 72 sind ebenfalls aufgeführt. Die Löslichkeit von O₂ im umgebenden Medium wird vernachlässigt, da diese etwa 20-fach^[125] geringer ist als in PFD. Supplementär zur Betrachtung der Nanokapseldispersionen werden in Analogie die relevanten Dispersionsvolumina auf humanes Vollblut übertragen. Bei humanem Vollblut sind die Berechnungen zur

Sauerstoffbindung darauf basierend, dass 100 mL Vollblut etwa 15 g Hämoglobin^[360] beinhalten und dass sich *in vivo* die *Hüfner-Zahl*^[359] einstellt.

Es kann konstatiert werden, dass die bilaterale Darstellung eine sehr gute Komparabilität widerspiegelt. 100 mL Vollblut lösen etwa doppelt so viel O₂-Volumen wie dasselbe Volumen Kapseldispersion. Allerdings können die viskositätsanalogen Verdünnungen nur etwa die Hälfte so viel O₂ solubilisieren wie Vollblut. Deswegen wurden, wie bereits oben erwähnt, bei den *i.v.*-Versuchen unverdünnte Dispersionen appliziert. Eine nachhaltige Wirkung wegen der somit erhöhten lokalen Viskosität oder Blutdruckveränderung (Hypotonie/Hypertonie) konnte dabei allerdings nicht beobachtet werden.

Verglichen mit anderen Produkten (z.B. *Oxygent*[®] AF0144) weisen die Kapseldispersionen eine ähnliche O₂-Löslichkeit auf. Jedoch lässt sich die O₂-Löslichkeit bei den Kapseldispersionen sogar noch etwas durch Aufkonzentrieren und Einkapselung größerer PFD-Mengen erhöhen. Das *Oxygent*[®] AF0144, ein Sauerstoffträger der zweiten Generation, ist jedoch eine Emulsion deren Stabilität in biologischer Umgebung höchst unwägbare ist, da der Emulgator im Blut ausgewaschen werden könnte und dies zu einer Koaleszenz des PFC mit allen daraus möglichen Konsequenzen führen könnte (s. Abschnitt 2.2.2). Vermutlich auch deswegen wurde die klinische Testphase (III) dieses Produktes zwischenzeitlich unterbrochen^[32].

Insofern ist der Nanokapselansatz deutlich prospektiver und variabler und könnte daher als Formulierung der dritten Generation betrachtet werden.

5.5.2 Intravenöse Infusionen

Für die Infusionen (vgl. Kap. 4.4.1) wurden die Dispersionen zweier 40-fach hochskalierter Ansätze mit relativ einheitlichen nachstehenden Größenverteilungen verwendet, wie in der nachfolgenden Abb. 73 gezeigt ist:

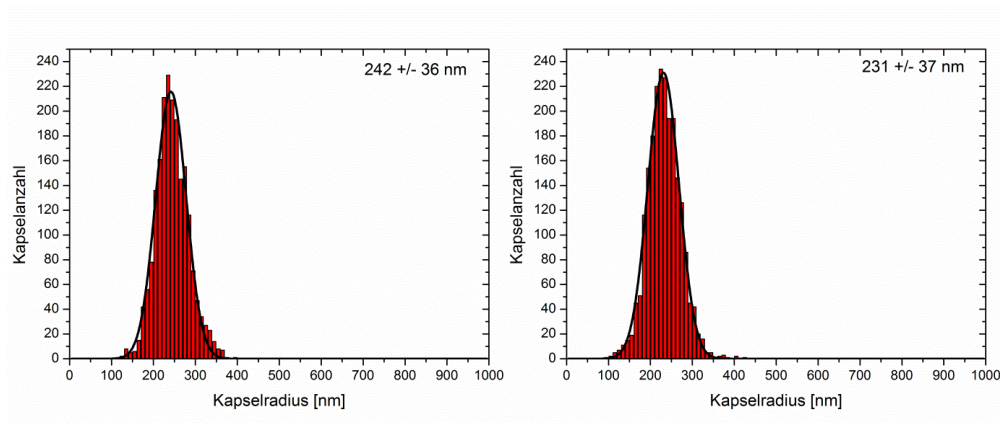


Abb. 73: Die beiden für die intravenösen Infusionen eingesetzten 40-fach hochskalierten PnBCA-PFD-Nanokapseldispersionen.

5.5.3 Leberperfusionen

Um den Einfluss der Leber auf die Größenverteilung der Nanokapseln zu studieren und die biologische Verwendbarkeit zu demonstrieren, wurden vor und zu unterschiedlichen Zeiten der 180-minütigen Perfusionen die Größenverteilungen gemessen. Es wurde eine Vielzahl von Perfusionen vorgenommen, die reproduzierende Ergebnisse lieferten und daher wird an dieser Stelle nur ein repräsentatives Resultat gezeigt.

Direkt im Anschluss an die Kapselsynthese wurden die Proben in den Kühlschrank bei ca. $4 \pm 0,5$ °C überführt und dort für etwa einen Tag gelagert, bis sie nach der Qualitätskontrolle an das medizinische Labor übergeben wurden. Vorab sei erwähnt, dass eine große Probenmenge für die Perfusion benötigt wurde. Daher wurden zwei (oder drei) 40-fache Ansätze vereint. Abb. 74 demonstriert den vernachlässigbaren Effekt auf die Größenverteilung:

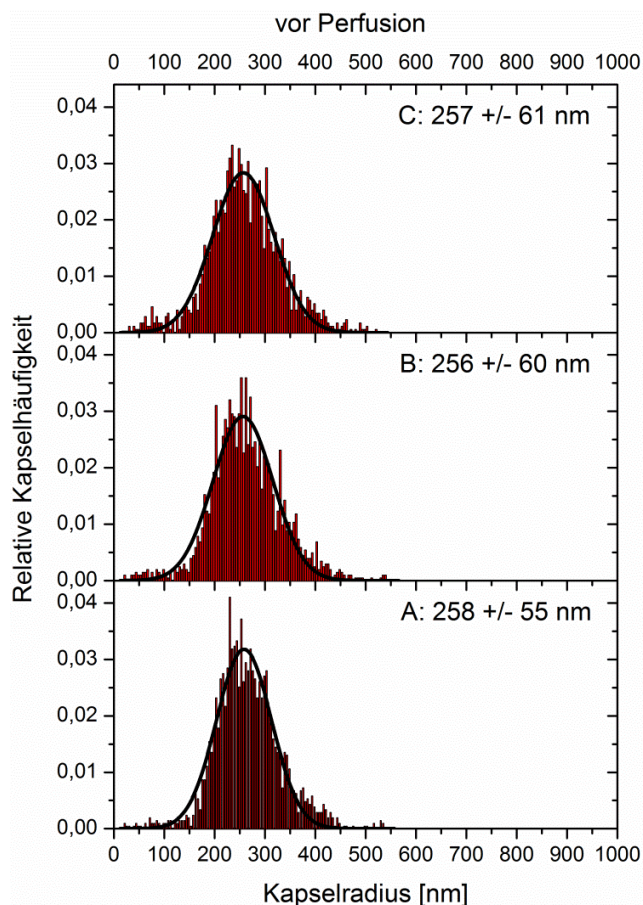


Abb. 74: Relative Größenverteilung⁸ von je einer 40-fach hochskalierten PnBCA-PFD-Nanokapseldispersion (A, B), die zu einer Dispersion C zusammengeführt wurden und mit der entsprechend verdünnt die Leber perfundiert wurde.

Aus den Größenverteilungen in Abb. 74 (C) und Abb. 75 (0 min) ist ersichtlich, dass sich der Radius von 257 ± 61 nm auf 280 ± 75 nm leicht ändert. Dies liegt hauptsächlich daran, dass die Probe initial mit KH-Puffer verdünnt wurde, bevor diese dann mit einiger zeitlicher Varianz einer erneuten Größenbestimmung unterzogen wurde.

In Abb. 75 ist außerdem ein signifikanter Einfluss der Perfusionszeit auf die Größenverteilung ersichtlich:

⁸ Das erste im Arbeitskreis etablierte *Nanoparticle Tracking (Dynamic Nanosizing Microscopy, DNM)* wurde für diese Untersuchung verwendet.

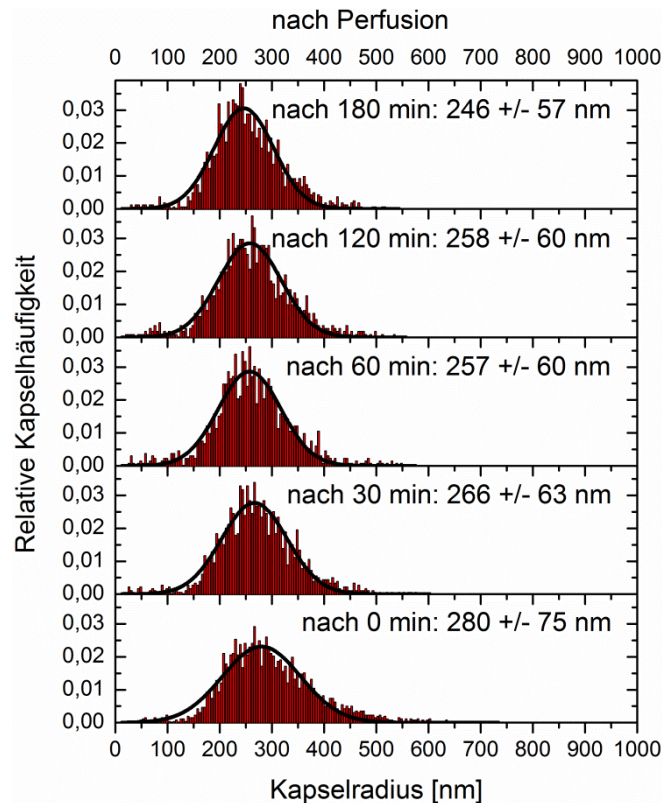


Abb. 75: Relative Größenverteilungen⁹ von Perfusatsproben, die zu unterschiedlichen Zeiten posthepatisch gezogen wurden.

Das Maximum der Größe verschiebt sich sukzessive von 280 ± 75 nm auf 246 ± 57 nm, während sich gleichfalls die Verteilungsbreiten verringern (Abb. 75 und Abb. 76). Es erhöht sich auch die relative Kapselhäufigkeit der gesamten Verteilung. Dies wird durch den Verlust größerer Kapselklassen interpretiert. Einerseits kann das durch einen Filtrationseffekt der Leber erklärt werden, andererseits kann dies durch die Wirkung des apparativen Gesamtsystems oder der Sedimentation in diesem erklärt werden. Im Nachhinein hat sich herausgestellt, dass der Membranoxygenator eine Senke, insbesondere für größere Nanokapseln, darstellt. Mit welcher Intensität beide Effekte auftreten, kann hier nicht eindeutig evaluiert werden. Es wird jedoch vermutet, dass die Leber, wenn nur zu einem geringen Anteil, zur Filtration größerer Kapseln beiträgt. Um dies genauer zu beleuchten, werden daher zukünftige Experimente mit einem anderen Sauerstoffsättigungssystem forciert. Des Weiteren soll das Schlauchsystem weiter optimiert werden, um das Totvolumen auf ein Mindestmaß zu reduzieren.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse eine gute Perspektive für derzeit und künftig beabsichtigte Anwendungen in biologischen Systemen auf.

⁹ Das erste im Arbeitskreis etablierte *Nanoparticle Tracking (Dynamic Nanosizing Microscopy, DNM)* wurde für diese Untersuchung verwendet.

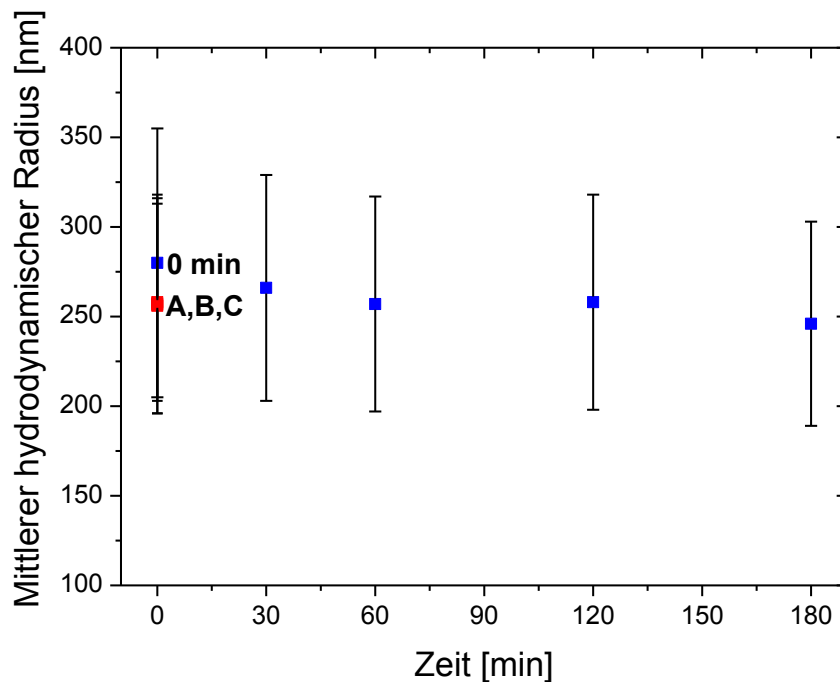


Abb. 76: Die mittleren hydrodynamischen Radien vor und während der Leberperfusion.

Anhand einer Perfusatsprobe, die während der Rattenleberperfusion nach 30 min entnommen worden ist, wurde unmittelbar nach der Perfusion und nach dreiwöchiger Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eine Größenbestimmung durchgeführt (Abb. 77). Eine relativ gute Konstanz und Invarianz des mittleren hydrodynamischen Radius, der Größenverteilung und des Bestimmtheitsmaßes kann konstatiert werden. Somit ist eine nach wenigen Wochen unter diesen Lagerungsbedingungen befindliche und anschließend aufgetaute Perfusatsprobe hinsichtlich ihrer Größencharakteristika nahezu mit der Ursprungsprobe vergleichbar und repräsentierbar. Leider konnte der Einfluss möglicher (Um-)Funktionalisierungen der Kapseln mit leberspezifischen Bestandteilen (z.B. Proteinen) in diesem Zusammenhang nicht studiert werden, da keine sterilen Bedingungen in diesen Experimenten gegeben sind und daher nach kurzer Zeit eine visuell erkennbare mikrobielle Kontamination der Rückstellproben auftrat.

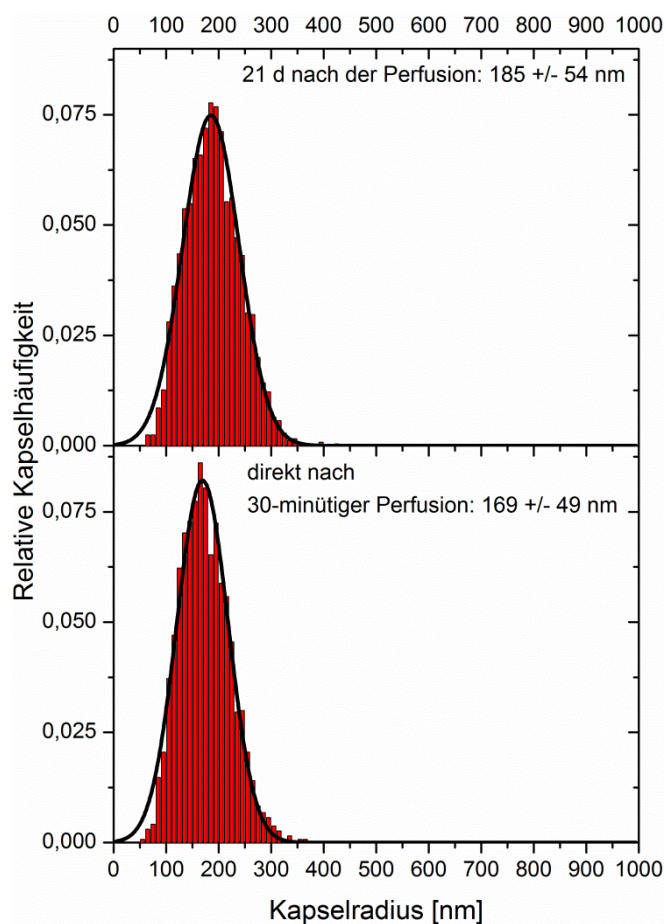


Abb. 77: Relative Größenverteilungen von einer PnBCA-PFD-Nanokapsel-Perfusatprobe nach 30-minütiger Perfusion und dreiwöchiger Lagerung bei -20 °C.

6. Zusammenfassung

Diese Arbeit beinhaltet eine systematische Studie über die Optimierung und Hochskalierung der Synthese von Perfluordecalin-gefüllten Poly-*n*-butylcyanoacrylat-Nanokapseln, die als künstliche Sauerstoffträger Verwendung finden sollen. Darüber hinaus wurde eine umfangreiche Charakterisierung des Systems vorgenommen und das Verhalten in biologischer Umgebung untersucht.

Bei der Syntheseoptimierung stellte sich heraus, dass die Molenbrüche der organischen bzw. wässrigen Phase hinsichtlich der ursprünglichen Standardsynthese (180 ± 30 nm) bereits ein Optimum gewünschter Dispersionscharakteristika erzielen. Unter Zuhilfenahme der ^{19}F -NMR-Spektroskopie und der Dekonvolution von Größenverteilungen konnte dabei im Rahmen dieser Analysen sogar die An- oder Abwesenheit von Nanosphären und Nanokapseln diskriminiert werden. Um eine bessere Sauerstoffversorgung zu bewirken, konnte zudem auch die eingekapselte PFD-Menge ohne Anpassung des Monomergehalts erhöht werden ohne die Größenverteilung kurzfristig und signifikant zu verändern. Diese Fähigkeit als auch die geforderte Gasreversibilität des Prozesses, konnten auch durch den Einsatz der ^{19}F -NMR-Spektroskopie dokumentiert werden. Für eine bessere längerfristige Stabilität muss allerdings der Monomergehalt angepasst werden, auch wenn dies zu leicht größeren mittleren hydrodynamischen Radien und eventuell dickeren Kapselwänden führt, da ansonsten eine mutmaßlich höhere Tendenz zur Koaleszenz besteht. In anderen Versuchen wurde eine Reduktion bzw. Substitution des Tensids angestrebt, da Tenside eine physiologisch negative Wirksamkeit haben können. Dieses Vorhaben erwies sich als relativ unproblematisch. Dabei verringerten sich zwar die Kapselgrößen etwas, jedoch wurde kein signifikanter Einfluss auf die Langzeitstabilität festgestellt. Die Verringerung der Kapselgrößen wurde hierbei physikalisch-chemisch interpretiert, nämlich durch die Veränderung der Oberflächenspannung und der „aktiven Grenzflächenkonzentration“ des Monomers durch die Präsenz des Tensids. Die Kapselsysteme präsentierten sich sogar ohne den Tensid-Einsatz als nahezu unverändert in ihrer Stabilität. Des Weiteren konnte die auch kritische Verwendung von Dichlormethan oder Aceton in Bezug auf ihre akute Toxizität eliminiert werden, ohne dass Mischungslücken im System entstanden. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass sich die Langzeitstabilitäten ohne Dichlormethan oder Aceton sogar deutlich verbessern. Analog dazu wurde auch in den Variationen mit größeren Lösungsmittelanteilen eine ausgeprägtere Alterungsempfindlichkeit nachgewiesen. Hingegen zeigte eine Erhöhung der Synthese-

Temperatur kaum einen Einfluss auf die Dispersionscharakteristika (193 ± 31 nm bei 40°C). Die T -Erniedrigung führte im Gegensatz dazu zu deutlich kleineren Nanokapseln (135 ± 30 nm bei 5°C), da in diesem T -Bereich anscheinend das sensible Zusammenspiel kinetischer und thermodynamischer Parameter, wie Reaktionsgeschwindigkeit, Diffusionskoeffizienten und Löslichkeiten, stärker beeinträchtigt werden als bei T -Erhöhung. Insgesamt konnte durch die Variationen der Bereich der metastabilen Ouzo-Region für dieses System besser abgegrenzt werden. Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass es möglich ist die Kapselgrößen z.B. über den Tensidgehalt oder über die Synthesetemperatur einzustellen ohne dabei einen Stabilitätsverlust hinnehmen zu müssen.

Die Standardsynthese zeigte sich außerdem als geeignet eine erfolgreiche Hochskalierung in den halbtechnischen Maßstab durchzuführen. Es zeigte sich dabei, dass die erhaltenen hochskalierten Dispersionen marginal monodisperser bei vergleichbarer Langzeitstabilität relativ zur Standardsynthese sind. Auch bei einem Stresstest bei 60°C -Lagerung erwies sich das Kapselsystem als relativ beständig.

Zusätzlich wurde die Morphologie der Nanokapseln mit verschiedenen elektronenmikroskopischen Methoden, wie SEM, ESEM, Cryo-TEM und SR-SIM, charakterisiert. Dabei wurde die sphäroidale Kapselstruktur bestätigt, die eine Wanddicke gemäß den Cryo-TEM-Aufnahmen von 9 ± 3 nm aufweist, also nach geometrischer Betrachtung etwa acht aufeinanderfolgende Polymerlagen umfasst. Sowie laut Berechnung die Nanokapseln eine zwei- bis dreifache Monomerbedeckung besitzen, die zu einer maximalen Kapselwanddicke von 2-3 nm führt. Nebenbei dokumentiert dieses Merkmal die Eignung für einen möglichst guten Gasaustausch. Das SR-SIM-Verfahren zeigte darüber hinaus, dass sich die PFD-Kerne der Kapseln auch mit den ausgewählten fluorierten Porphyrin-basierten Fluoreszenzfarbstoffen markieren lassen, ohne dass das Syntheseergebnis erkennbar beeinflusst wird. Dadurch wird prinzipiell ermöglicht das Verhalten und den Verbleib der Nanokapseln im biologischen System (z.B. Gewebe) zu studieren.

Weiterhin wurde ein Beitrag zum Verständnis der exzellenten Gaslöslichkeiten von Perfluorcarbonen, respektiv Perfluordecalin, *via* Raman-Spektroskopie und quantenchemischer Rechnungen geleistet. Mithilfe der theoretischen Rechnungen konnten drei Energieminima für das *trans*-PFD und ein Minimum für das *cis*-PFD verifiziert werden, deren Wechselwirkungsenergien im Bereich von etwa -3 bis -4 kJ/mol liegen, also rein dispersiven

Kräften entsprechen. Die Isomere differieren dabei nur geringfügig in ihrer Wechselwirkungsenergie mit O₂, daher wird auf eine ähnliche Sauerstofflöslichkeit geschlossen. Auch die Bindungsabstände in den dabei berechneten Geometrien weisen nicht auf eine chemische Beteiligung in der vermutlich ausschließlich physikalischen Gaslöslichkeit hin. Dieser Schluss konnte auch aus den Ergebnissen der Mikro-Raman-Spektroskopie gezogen werden, die zudem erstmals als geeignete Methode für die Bestimmung von Henry-Konstanten in diesem Zusammenhang erschlossen werden konnte. Der allgemein anerkannte und qualitative Trend für die zunehmende Gaslöslichkeit von Perfluorcarbonen in der Reihe N₂ < O₂ << CO₂ wurde dabei bestätigt und erstmalig für das PFD quantitativ unter Laborbedingungen determiniert.

Um die Verwendbarkeit der PnBCA-PFD-Nanokapseln in biologischen Systemen zu gewährleisten, wurde initial die Synthese auf den kommerziell erhältlichen Wundkleber Indermil® umgestellt, der bereits steril verpackt geliefert wird. Dadurch ist ein erster Schritt für zukünftige medizinische Projekte bereits vollzogen, bei denen ein steriles und medizinisch zugelassenes Produkt bereitgestellt werden soll. Denkbar wäre auch eine nachträgliche schnelle Pasteurisierung, da sich das Kapselsystem im Stresstest bei 60 °C zumindest über einen gewissen Zeitraum als relativ resistent präsentierte. Die rheologischen Eigenschaften der Nanokapseldispersionen wurden ebenfalls bestimmt, wodurch in zukünftigen medizinisch-biologischen Experimenten eine Abschätzung des physiologisch wichtigen Parameters, der Viskosität, möglich wird. Mit den Viskositätsmessungen konnte außerdem physikalisch fundiert werden, in welchem Bereich der Einsatz bestimmter Dispersionsvolumina biologisch zumutbar ist. In medizinischen Experimenten (Leberperfusionen und intravenöse Infusionen) wurde weiterhin die Anwendbarkeit der synthetisierten Nanokapseln auf die Probe gestellt. Hierbei wurde gefunden, dass die Nanokapseln keine wahrnehmbaren negativen Auswirkungen auf die Lebern bzw. Versuchstiere im Beobachtungszeitraum hatten. Die Experimente mit perfundierten Rattenlebern und *in vivo* stellten sich also insgesamt als prospektiv für die Weiterentwicklung dieses Kapselsystems heraus.

7. Quellenverzeichnis

- [1] R. P. Feynman, *Eng. Sci.* **1960**, *23*, 22.
- [2] M. K. Teli, S. Mutalik, G. K. Rajanikant, *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 1882.
- [3] H. Goesmann, C. Feldmann, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1402.
- [4] J. Kreuter, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **1994**, *19*, 253.
- [5] J. Kreuter, *Int. J. Pharm.* **1983**, *14*, 43.
- [6] J. Kreuter, *J. Controlled Release* **1991**, *16*, 169.
- [7] J. Kreuter, *Pharm. Acta Helv.* **1983**, *58*, 196.
- [8] T. Hofmann, *Chem. unserer Zeit* **2004**, *38*, 24.
- [9] K. K. Jain, in *NanoBioTechnology: BioInspired Devices and Materials of the Future, Vol. 1* (Eds.: O. Shoseyov, I. Levy), Humana Press Inc., Totowa, NJ, **2008**, pp. 303.
- [10] H. Devalapally, A. Chakilam, M. M. Amiji, *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96*, 2547.
- [11] K. K. Jain, *Neurodegener. Dis.* **2007**, *4*, 287.
- [12] J. H. Choi, K. H. Chen, J.-H. Han, A. M. Chaffee, M. S. Strano, *Small* **2009**, *5*, 672.
- [13] A. E. Nel, L. Mädler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, M. Thompson, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 543.
- [14] L. Treuel, M. Malissek, S. Grass, J. Diendorf, D. Mahl, W. Meyer-Zaika, M. Epple, *J. Nanopart. Res.* **2012**, *14*, 1.
- [15] A. Nel, T. Xia, L. Mädler, N. Li, *Science* **2006**, *311*, 622.
- [16] G. Oberdörster, A. Maynard, K. Donaldson, V. Castranova, J. Fitzpatrick, K. Ausman, J. Carter, B. Karn, W. Kreyling, D. Lai, S. Olin, N. Monteiro-Riviere, D. Warheit, H. Yang, *Part. Fibre Toxicol.* **2005**, *2*, 8.
- [17] H. Hillaireau, P. Couvreur, *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 2873.
- [18] C. Mayer, *Int. J. Artif. Organs* **2005**, *28*, 1163.
- [19] P. Couvreur, C. Vauthier, *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 1417.
- [20] R. Duncan, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 347.
- [21] A. T. Florence, T. L. Whateley, D. A. Wood, *J. Pharm. Pharmacol.* **1979**, *31*, 422.
- [22] D. A. Wood, T. L. Whateley, A. T. Florence, *Int. J. Pharm.* **1981**, *8*, 35.
- [23] P. Couvreur, B. Kante, M. Roland, P. Guiot, P. Bauduin, P. Speiser, *J. Pharm. Pharmacol.* **1979**, *31*, 331.
- [24] W. P. Yu, T. M. S. Chang, *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **1994**, *22*, 889.
- [25] T. M. S. Chang, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1998**, *45*, 3.
- [26] C. Damgé, C. Michel, M. Aprahamian, P. Couvreur, J. P. Devissaguet, *J. Controlled Release* **1990**, *13*, 233.
- [27] C. Michel, M. Aprahamian, L. Defontaine, P. Couvreur, C. Damgé, *J. Pharm. Pharmacol.* **1991**, *43*, 1.
- [28] C. Tasset, N. Barette, S. Thysman, J. M. Ketelslegers, D. Lemoine, V. Préat, *J. Controlled Release* **1995**, *33*, 23.
- [29] P. Couvreur, B. Kante, L. Grislain, M. Roland, P. Speiser, *J. Pharm. Sci.* **1982**, *71*, 790.
- [30] N. Al Khouri Fallouh, L. Roblot-Treupel, H. Fessi, J. P. Devissaguet, F. Puisieux, *Int. J. Pharm.* **1986**, *28*, 125.
- [31] M. Wohlgemuth, W. Mächtle, C. Mayer, *J. Microencapsulation* **2000**, *17*, 437.
- [32] O. Habler, A. Pape, J. Meier, B. Zwißler, *Anaesthesist* **2005**, *54*, 741.
- [33] A. E. Goetz, *Anaesthesist* **2005**, *54*, 739.
- [34] I. K. Mushahwar, *J. Med. Virol.* **2007**, *79*, 1229.

- [35] S. Dinkelmann, H. Northoff, *Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.* **2003**, 38, 47.
- [36] R. M. Winslow, *Vox Sang.* **2006**, 91, 102.
- [37] J. G. Riess, *Chem. Rev.* **2001**, 101, 2797.
- [38] D. R. Spahn, *Crit. Care* **1999**, 3, 93.
- [39] D. R. Spahn, M. Jamnicki, *Intensivmed.* **1999**, 36, 243.
- [40] K. C. Lowe, *Tissue Eng.* **2003**, 9, 389.
- [41] D. R. Spahn, K. F. Waschke, T. Standl, J. Motsch, L. Van Huynegem, M. Welte, H. Gombotz, P. Coriat, L. Verkh, S. Faithfull, P. Keipert, *Anesthesiology* **2002**, 97, 1338.
- [42] M. Paxian, H. Rensing, K. Geckeis, I. Bauer, D. Kubulus, D. R. Spahn, M. Bauer, *Anesthesiology* **2003**, 98, 1391.
- [43] S. A. Gould, E. E. Moore, D. B. Hoyt, J. M. Burch, J. B. Haenel, J. Garcia, R. DeWoskin, G. S. Moss, *J. Am. Coll. Surg.* **1998**, 187, 113.
- [44] J. Hughes, G. S., E. J. Antal, P. K. Locker, S. F. Francom, W. J. Adams, J. Jacobs, E. E., *Crit. Care Med.* **1996**, 24, 756.
- [45] H. de Groot, C. Mayer, F. Petrat, M. Kirsch, *Artificial Oxygen Carriers And Use Thereof*, WO 2010/003647 A2, Universität Duisburg-Essen, **2010**.
- [46] N. A. Rosen, H. W. Hopf, T. K. Hunt, *Wound Repair Regen.* **2006**, 14, 55.
- [47] J. L. Schroeder, J. M. Highsmith, H. F. Young, B. E. Mathern, *J. Neurosurg. Spine* **2008**, 9, 213.
- [48] K. T. Oldham, K. S. Guice, D. Gore, W. K. Gourley, T. E. Lobe, *Am. J. Surg.* **1987**, 153, 291.
- [49] R. Saxena, A. D. Wijnhoud, H. Carton, W. Hacke, M. Kaste, R. J. Przybelski, K. N. Stern, P. J. Koudstaal, *Stroke* **1999**, 30, 993.
- [50] K. Ueda, T. Genda, I. Hirata, M. Shimada, T. Shibata, T. Ueda, R. Omoto, *J. Heart Lung Transplant.* **1992**, 11, 646.
- [51] K. A. O'Donnell, M. G. Caty, S. Zheng, J. E. Rossman, R. G. Azizkhan, *J. Pediatr. Surg.* **1997**, 32, 361.
- [52] B. D. Spiess, R. P. Cochran, *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* **1996**, 10, 83.
- [53] F. Faude, S. Wolf, P. Wiedemann, *Ophthalmologe* **2000**, 97, 652.
- [54] K. Kobuch, D. H. Menz, H. Hoerauf, J. H. Dresch, V.-P. Gabel, *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2001**, 239, 635.
- [55] M. Guichard, *Radiother. Oncol.* **1991**, 20, Supplement, 59.
- [56] K. M. Sekins, T. H. Shaffer, M. R. Wolfson, *LUNG CANCER HYPERTHERMIA VIA ULTRASOUND AND/OR CONVECTION WITH PERFLUORO-CHEMICAL LIQUIDS*, U.S. Patent 5,158,536, Biopulmonics, Inc., Redmond, Wash., Temple University - Of the Commonwealth System of Higher Education, Philadelphia, Pa., **1992**.
- [57] K. Yokoyama, *Surg. Today* **1978**, 8, 342.
- [58] V. V. Baker, C. C. Egley, R. C. Cefalo, H. Proctor, *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1986**, 155, 1128.
- [59] J. A. Kylstra, *Undersea Biomed. Res.* **1974**, 1, 259.
- [60] B. D. Spiess, R. J. McCarthy, K. J. Tuman, A. W. Woronowicz, K. A. Tool, A. D. Ivankovich, *Undersea Biomed. Res.* **1988**, 15, 31.
- [61] P. R. Lynch, L. J. Krasner, T. Vinciguerra, T. H. Shaffer, *Undersea Biomed. Res.* **1989**, 16, 275.
- [62] J. S. Greenspan, M. R. Wolfson, T. H. Shaffer, *Semin. Perinatol.* **2000**, 24, 396.
- [63] M. L. Costantino, *Int. J. Artif. Organs* **1996**, 19, 284.
- [64] L. C. Clark, Jr., F. Gollan, *Science* **1966**, 152, 1755.
- [65] U. Flögel, Z. Ding, H. Hardung, S. Jander, G. Reichmann, C. Jacoby, R. Schubert, J. Schrader, *Circulation* **2008**, 118, 140.
- [66] S. H. Baete, J. Vandecasteele, Y. De Deene, *Phys. Med. Biol.* **2011**, 56, 2535.

- [67] T. Q. Duong, C. Iadecola, S. G. Kim, *Magn. Reson. Med.* **2001**, 45, 61.
- [68] J. M. Janjic, E. T. Ahrens, *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* **2009**, 1, 492.
- [69] U. Zimmermann, U. Nöth, P. Gröhn, A. Jork, K. Ulrichs, J. Lutz, A. Haase, *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **2000**, 28, 129.
- [70] R. F. Mattrey, *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **1994**, 22, 295.
- [71] W. D. Kirkland, *FLUOROCARBON CONTRAST MEDIA FOR USE WITH MRI AND RADIOGRAPHIC IMAGING*, U.S. Patent 5,496,535, Alliance Pharmaceutical Corp., San Diego, Calif., **1996**.
- [72] E. Pisani, N. Tsapis, J. Paris, V. Nicolas, L. Cattel, E. Fattal, *Langmuir* **2006**, 22, 4397.
- [73] K. C. Lowe, *J. Mater. Chem.* **2006**, 16, 4189.
- [74] H. Ohyanagi, S. Nakaya, S. Okumura, Y. Saitoh, *Artif. Organs* **1984**, 8, 10.
- [75] K. Waxman, K. K. Tremper, B. F. Cullen, G. Mason, *Arch. Surg.* **1984**, 119, 721.
- [76] K. Kobayashi, H. Horinouchi, M. Watanabe, Y. Izumi, Y. Teramura, A. Nakagawa, Y. Huang, K. Sou, H. Sakai, T. Komatsu, S. Takeoka, E. Tsuchida, in *Artificial Oxygen Carrier, Vol. 12* (Eds.: K. Kobayashi, E. Tsuchida, H. Horinouchi), Springer-Verlag Tokyo, **2005**, pp. 8.
- [77] B. Remy, G. Deby-Dupont, M. Lamy, *Br. Med. Bull.* **1999**, 55, 277.
- [78] R. M. Winslow, *Br. J. Haematol.* **2000**, 111, 387.
- [79] J. G. Riess, M. Le Blanc, *Angew. Chem.* **1978**, 90, 654.
- [80] J. G. Riess, M. P. Krafft, in *Blood Substitutes, Vol. 1* (Ed.: R. M. Winslow), Elsevier Academic Press, Inc., **2006**, pp. 259.
- [81] M. P. Krafft, J. G. Riess, J. G. Weers, in *Submicronic Emulsions in Drug Targeting and Delivery* (Ed.: S. Benita), Harwood Academic, Amsterdam, **1998**, pp. 235.
- [82] T. M. S. Chang, in *Artificial cells: biotechnology, nanomedicine, regenerative medicine, blood substitutes, bioencapsulation, and cell/stem cell therapy, Vol. 1* (Ed.: T. M. S. Chang), World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, **2007**, pp. 31.
- [83] T. M. S. Chang, *Science* **1964**, 146, 524.
- [84] S. F. Rabiner, J. R. Helbert, H. Lopas, L. H. Friedman, *J. Exp. Med.* **1967**, 126, 1127.
- [85] M. F. Perutz, *Proc. R. Soc. London, Ser. B* **1980**, 208, 135.
- [86] T. M. S. Chang, *Baillière's Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **2000**, 13, 651.
- [87] W. Lieberthal, in *Red Blood Cell Substitutes: Basic Principles and Clinical Applications, Vol. 1* (Eds.: A. S. Rudolph, R. Rabinovici, G. Z. Feuerstein), Marcel Dekker, Inc., New York, **1998**, pp. 189.
- [88] RCSB PDB PROTEIN DATA BANK, *OXY T STATE HAEMOGLOBIN: OXYGEN BOUND AT ALL FOUR HAEMS*, 10.2210/pdb1gzx/pdb
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?pdbId=1GZX> (11.10.2012),
- [89] M. Paoli, R. Liddington, J. Tame, A. Wilkinson, G. Dodson, *J. Mol. Biol.* **1996**, 256, 775.
- [90] M. F. Perutz, *Trends Biochem. Sci.* **1989**, 14, 42.
- [91] T. M. S. Chang, *Trends Biotechnol.* **1999**, 17, 61.
- [92] T. M. S. Chang, in *Artificial cells: biotechnology, nanomedicine, regenerative medicine, blood substitutes, bioencapsulation, and cell/stem cell therapy, Vol. 1* (Ed.: T. M. S. Chang), World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, **2007**, pp. 93.
- [93] T. M. S. Chang, *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol.* **2006**, 34, 551.
- [94] T. M. S. Chang, *Artif. Organs* **2004**, 28, 789.
- [95] T. M. S. Chang, *J. Intern. Med.* **2003**, 253, 527.
- [96] T. M. S. Chang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1971**, 44, 1531.
- [97] J. T. Wong, *Biomater. Artif. Cells Artif. Organs* **1988**, 16, 237.

- [98] Y. Iwashita, A. Yabuki, K. Yamaji, K. Iwasaki, T. Okami, C. Hirata, K. Kosaka, *Biomater. Artif. Cells Artif. Organs* **1988**, 16, 271.
- [99] S. A. Acharya, B. N. Manjula, in *Blood Substitutes, Vol. 1* (Ed.: R. M. Winslow), Elsevier Academic Press, Inc., **2006**, pp. 460.
- [100] X. Li, X. Zhang, Q. Liu, *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol.* **2005**, 33, 13.
- [101] H. F. Bunn, J. H. Jandl, *Trans. Assoc. Am. Phys.* **1968**, 81, 147.
- [102] J. A. Walder, R. H. Zaugg, R. Y. Walder, J. M. Steele, I. M. Klotz, *Biochem.* **1979**, 18, 4265.
- [103] K. Burhop, D. Gordon, T. Estep, *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol.* **2004**, 32, 353.
- [104] S. J. Hoffman, D. L. Looker, J. M. Roehrich, P. E. Cozart, S. L. Durfee, J. L. Tedesco, G. L. Stetler, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, 87, 8521.
- [105] J. W. Freytag, D. Templeton, in *Red Blood Cell Substitutes: Basic Principles and Clinical Applications, Vol. 1* (Eds.: A. S. Rudolph, R. Rabinovici, G. Z. Feuerstein), Marcel Dekker, Inc., New York, **1998**, pp. 325.
- [106] D. H. Doherty, M. P. Doyle, S. R. Curry, R. J. Vali, T. J. Fattor, J. S. Olson, D. D. Lemon, *Nat. Biotechnol.* **1998**, 16, 672.
- [107] T. M. S. Chang, in *Red Blood Cell Substitutes: Basic Principles and Clinical Applications, Vol. 1* (Eds.: A. S. Rudolph, R. Rabinovici, G. Z. Feuerstein), Marcel Dekker, Inc., New York, **1998**, pp. 468.
- [108] W. T. Phillips, B. Goins, R. Klipper, B. G. Cook, C. Martin, L. Lemen, P. A. Jerabek, S. Khalvati, P. T. Fox, R. O. Cliff, V. Kwasiborski, A. S. Rudolph, in *Blood Substitutes - Present and Future Perspectives, Vol. 1* (Ed.: E. Tsuchida), Elsevier Science S.A., Lausanne, **1998**, pp. 147.
- [109] T. M. S. Chang, W. P. Yu, in *Blood Substitutes - Present and Future Perspectives, Vol. 1* (Ed.: E. Tsuchida), Elsevier Science S.A., Lausanne, **1998**, pp. 161.
- [110] J. A. Kylstra, M. O. Tissing, A. van der Maë'n, R. P. de Graaf, *ASAIO J.* **1962**, 8, 378.
- [111] F. Gollan, L. C. Clark, *Trans. Assoc. Am. Physicians* **1967**, 80, 102.
- [112] F. Gollan, L. C. Clark, Jr., *Ala. J. Med. Sci.* **1967**, 4, 336.
- [113] F. Gollan, J. L. C. Clark, *Physiologist* **1966**, 9, 191.
- [114] Den Urheber der Fotografie "UNDERWATER MOUSE" konnte trotz intensiver Recherche nicht ausfindig gemacht werden. Nach persönlicher Auskunft von Paul Di Filippo, ein Blogger von www.weirduniverse.net, wird das Photo auf ein Alter von etwa 50 Jahren eingeschätzt, welches auf vielzähligen Homepages ohne Angabe des Urhebers zu finden ist und daher nicht mehr zugeordnet werden kann. Vermutlich wurde das Photo von L. C. Clark, Jr., aufgenommen († 25.09.2005). *UNDERWATER MOUSE / Artificial blood*, http://www.weirduniverse.net/blog/comments/underwater_mouse/, <http://www.frca.co.uk/article.aspx?articleid=100112> (16.10.2012), **2009 (picture)**, **2004 (AnaesthesiaUK created)**, **2010 (AnaesthesiaUK updated)**.
- [115] H. A. Sloviter, T. Kamimoto, *Nature* **1967**, 216, 458.
- [116] R. M. Winslow, in *Blood Substitutes, Vol. 1* (Ed.: R. M. Winslow), Elsevier Academic Press, Inc., **2006**, pp. 10.
- [117] R. P. Geyer, R. G. Monroe, K. Taylor, in *Organ Perfusion and Preservation* (Eds.: J. C. Norman, J. Folkman, W. G. Hardison, L. E. Rudolf, F. J. Veith), Appleton-Century-Crofts, Inc., New York, **1968**, p. 85.
- [118] R. P. Geyer, R. G. Monroe, K. Taylor, *Fed. Proc.* **1968**, 27, 384.
- [119] R. P. Geyer, *Fed. Proc.* **1970**, 29, 1758.
- [120] R. P. Geyer, *New Engl. J. Med.* **1973**, 289, 1077.
- [121] R. P. Geyer, K. Taylor, E. B. Duffett, R. Eccles, *Fed. Proc.* **1973**, 32, 927.
- [122] J. Bauer, M. Zähres, A. Zellermann, M. Kirsch, F. Petrat, H. d. Groot, C. Mayer, *J. Microencapsulation* **2010**, 27, 122.

- [123] C. Stephan, C. Schlawne, S. Grass, I. N. Waack, K. B. Ferenz, M. Bachmann, S. Barnert, R. Schubert, M. Bastmeyer, H. de Groot, C. Mayer, "Artificial Oxygen Carriers Based on Perfluorodecalin-Filled Poly(*n*-butyl-cyanoacrylate) Nanocapsules", *J. Microencapsulation* **2013** (accepted).
- [124] C. Stephan, S. Grass, L. Treuel, M. Zähres, H. Somnitz, C. Mayer, "Spectroscopic and Computational Characterization of the Gas Exchange Behavior of Perfluorodecalin-Filled Poly(*n*-butyl-cyanoacrylate) Nanocapsules as an Approach for Artificial Oxygen Carriers", **2013** (in preparation).
- [125] J. G. Riess, *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol.* **2005**, 33, 47.
- [126] O. P. Habler, K. F. W. Messmer, *Baillière's Clin. Anaesthesiol.* **1997**, 11, 289.
- [127] J. Erhard, M. Kirsch, T. Bramey, F. Petrat, C. Mayer, H. de Groot, *Transfusion* **2010**, 50, 2517.
- [128] A. Loxley, B. Vincent, *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, 208, 49.
- [129] J. G. Riess, M. P. Krafft, *MRS Bull.* **1999**, 24, 42.
- [130] J. G. Riess, *Tetrahedron* **2002**, 58, 4113.
- [131] K. C. Lowe, *Blood Rev.* **1999**, 13, 171.
- [132] J. G. Riess, *Artif. Organs* **1984**, 8, 44.
- [133] D. D. Lawson, J. Moacanin, K. V. Scherer Jr., T. F. Terranova, J. D. Ingham, *J. Fluorine Chem.* **1978**, 12, 221.
- [134] W. Henry, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **1803**, 93, 29.
- [135] J. G. Riess, M. Le Blanc, *Pure Appl. Chem.* **1982**, 54, 2383.
- [136] M. P. Krafft, A. Chittofrati, J. G. Riess, *Curr. Opin. Colloid Interf. Sci.* **2003**, 8, 251.
- [137] P. E. Keipert, *Blood Subst. Princ. Meth. Prod. Clin. Trials* **1998**, 2, 127.
- [138] D. R. Spahn, B. J. Leone, J. G. Reves, T. Pasch, *Anesth. Analg.* **1994**, 78, 1000.
- [139] J. G. Riess, *Biomater. Artif. Cells Immobil. Biotechnol.* **1992**, 20, 183.
- [140] J. W. Sargent, R. J. Sefel, *Fed. Proc.* **1970**, 19, 1699.
- [141] L. C. Clark, Jr., E. P. Wesseler, M. L. Miller, S. Kaplan, *Microvasc. Res.* **1974**, 8, 320.
- [142] L. C. Clark, Jr., F. Becattini, S. Kaplan, V. Obrock, D. Cohen, C. Becker, *Science* **1973**, 181, 680.
- [143] L. C. Clark, Jr., in *Pathophysiology of shock, anoxia, and ischemia* (Eds.: R. A. Cowley, B. F. Trump), Williams & Wilkins, Baltimore, **1982**, pp. 507.
- [144] R. E. Moore, L. C. Clark, Jr., in *Symposium on organofluorine compounds in medicine and biology* (Eds.: R. Frey, H. Beisbarth, K. Stosseck), W. Zuckschwerdt Verlag, Amer. Chem. Soc. Natl. Meeting, Las Vegas, **1982**, pp. 50.
- [145] N. S. Faithfull, *Biomater. Artif. Cells Immobil. Biotechnol.* **1992**, 20, 797.
- [146] P. E. Keipert, *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **1995**, 23, 381.
- [147] N. S. Faithfull, *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **1994**, 22, 181.
- [148] J. Lutz, B. Decke, M. Bäuml, H.-G. Schulze, *Pflug. Arch. Eur. J. Phy.* **1978**, 376, 1.
- [149] N. Shah, A. Mehra, *ASAIO J.* **1996**, 42, 181.
- [150] R. D. Braun, R. A. Linsenmeier, T. K. Goldstick, *J. Appl. Physiol.* **1992**, 72, 1960.
- [151] S. N. Vaslef, T. K. Goldstick, *ASAIO J.* **1994**, 40, M643.
- [152] S. Patel, A. Mehra, *ASAIO J.* **1998**, 44, 144.
- [153] S. Patel, A. Mehra, *ASAIO J.* **1998**, 44, 157.
- [154] E. V. Perevedentseva, A. R. Zaritskiy, M. V. Fok, I. N. Kuznetsova, *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol.* **1998**, 26, 223.
- [155] H. de Groot, C. Mayer, *Persönliche Mitteilung*, Universität Duisburg-Essen, **2010-2013**.
- [156] S. A. Vitale, J. L. Katz, *Langmuir* **2003**, 19, 4105.
- [157] F. Ganachaud, J. L. Katz, *ChemPhysChem* **2005**, 6, 209.
- [158] N. L. Sitnikova, R. Sprik, G. Wegdam, E. Eiser, *Langmuir* **2005**, 21, 7083.
- [159] I. Grillo, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **2003**, 225, 153.

- [160] E. Scholten, E. v. d. Linden, H. This, *Langmuir* **2008**, 24, 1701.
- [161] J. Aubry, F. Ganachaud, J.-P. Cohen Addad, B. Cabane, *Langmuir* **2009**, 25, 1970.
- [162] K. Bouchemal, S. Briancon, E. Perrier, H. Fessi, *Int. J. Pharm.* **2004**, 280, 241.
- [163] D. Horn, J. Rieger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 4330.
- [164] M. Volmer, A. Weber, *Z. Phys. Chem.* **1926**, 119, 277.
- [165] V. K. LaMer, R. H. Dinegar, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 4847.
- [166] J. T. Davies, D. A. Haydon, *Proc. Int. Cong. Surf. Act.* **1957**, 1, 417.
- [167] J. C. Lopez-Montilla, P. E. Herrera-Morales, S. Pandey, D. O. Shah, *J. Dispersion Sci. Technol.* **2002**, 23, 219.
- [168] M. C. Brick, H. J. Palmer, T. H. Whitesides, *Langmuir* **2003**, 19, 6367.
- [169] C. A. Miller, *Surfactant Sci. Ser.* **2006**, 132, 107.
- [170] V. J. Anderson, E. H. A. de Hoog, H. N. W. Lekkerkerker, *Phys. Rev. E* **2001**, 65, 011403.
- [171] B. A. Rozenberg, R. Tenne, *Prog. Polym. Sci.* **2008**, 33, 40.
- [172] A. Fick, *Ann. Phys.* **1855**, 170, 59.
- [173] A. Fick, *Die medizinische Physik: Supplement-Band zu Müller-Pouillet's Lehrbuch der Physik: für Mediziner*, Vieweg, **1856**.
- [174] A. Fick, *Die medizinische Physik*, Vieweg, **1858**.
- [175] F. Chouinard, F. W. K. Kan, J.-C. Leroux, C. Foucher, V. Lenaerts, *Int. J. Pharm.* **1991**, 72, 211.
- [176] R. P. Feynman, *Statistical Mechanics: A Set of Lectures*, W.A. Benjamin Inc., Reading, MA, **1972**.
- [177] N. Behan, C. Birkinshaw, *Macromol. Rapid Commun.* **2000**, 21, 884.
- [178] C. Limouzin, A. Caviggia, F. Ganachaud, P. Hemery, *Macromolecules* **2003**, 36(3), 667.
- [179] N. Behan, C. Birkinshaw, N. Clarke, *Biomaterials* **2001**, 22, 1335.
- [180] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen: Organische Reaktionen, Stereochemie, moderne Synthesemethoden, Vol. 3. Aufl.*, Elsevier - Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **2004**.
- [181] N. Al Khouri Fallouh, H. Fessi, L. Roblot-Treupel, J.-P. Devissaguet, F. Puisieux, *Pharm. Acta Helv.* **1986**, 61, 274.
- [182] N. Al Khouri Fallouh, *Nanocapsules de polyalkylcyanoacrylates. Nouveaux vecteurs de médicaments. Etude galénique et pharmacocinetique.* (Doctoral Thesis), Université Paris-Sud XI, **1984**.
- [183] M. Gallardo, G. Couarraze, B. Denizot, L. Treupel, P. Couvreur, F. Puisieux, *Int. J. Pharm.* **1993**, 100, 55.
- [184] C. V. Sternling, L. E. Scriven, *A.I.Ch.E. J.* **1959**, 5, 514.
- [185] C. A. Miller, *Surf. Coll. Sci.* **1978**, 10, 227.
- [186] K. J. Ruschak, C. A. Miller, *Ind. Eng. Chem. Fundam.* **1972**, 11, 534.
- [187] E. O. Egbogah, R. A. Dawe, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **1985**, 35A, 132.
- [188] A. T. Florence, M. E. Haq, J. R. Johnson, *J. Pharm. Pharmacol.* **1976**, 28, 539.
- [189] A. Baszkin, P. Couvreur, M. Deyme, S. Henry-Michelland, G. Albrecht, *J. Pharm. Pharmacol.* **1987**, 39, 973.
- [190] A. Baszkin, M. Deyme, P. Couvreur, G. Albrecht, *J. Bioact. Compat. Polym.* **1989**, 4, 110.
- [191] D. Wielebinski, G. H. Findenegg, *Prog. Colloid Polym. Sci.* **1988**, 77, 100.
- [192] C. A. Miller, *Colloids Surf.* **1988**, 29, 89.
- [193] J. L. Castillo, M. G. Velarde, *J. Colloid Interface Sci.* **1985**, 108, 264.
- [194] H.-D. Dörfler, in *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme: Physik und Chemie, Vol. I* (Ed.: H.-D. Dörfler), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2002**, pp. 557.
- [195] R. Brown, *Edin. New Phil. J.* **1828**, 358.

- [196] A. Einstein, *Ann. Phys.* **1906**, 324, 371.
- [197] M. von Smoluchowski, *Ann. Phys.* **1906**, 326, 756.
- [198] M. von Smoluchowski, *Physikal. Z.* **1916**, 17, 585.
- [199] M. von Smoluchowski, *Physikal. Z.* **1916**, 17, 557.
- [200] S. Y. Shulepov, G. Frens, *J. Colloid Interface Sci.* **1995**, 170, 44.
- [201] S. Y. Shulepov, G. Frens, *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, 182, 388.
- [202] B. V. Derjaguin, L. D. Landau, *Acta Physicochim USSR* **1941**, 14, 633.
- [203] E. J. W. Verwey, J. T. G. Overbeek, *Theory of stability of lyophobic colloids*, Elsevier, Amsterdam, **1948**.
- [204] D. H. Everett, *Basic Principles of Colloid Science, Vol. 1*, The Royal Society of Chemistry, **1988**.
- [205] P. G. de Gennes, *Adv. Colloid Interface Sci.* **1987**, 27, 189.
- [206] P. Sandkühler, J. Sefcik, M. Morbidelli, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2004**, 108–109, 133.
- [207] M. Lattuada, P. Sandkühler, H. Wu, J. Sefcik, M. Morbidelli, *Macromol. Symp.* **2004**, 206, 307.
- [208] K. Ishizu, K. Tsubaki, A. Mori, S. Uchida, *Prog. Polym. Sci.* **2003**, 28, 27.
- [209] V. Abetz, P. F. W. Simon, in *Adv. Polym. Sci., Vol. 189* (Ed.: V. Abetz), Springer Berlin / Heidelberg, **2005**, pp. 125.
- [210] Sigma-Aldrich Co. LLC., *Sicherheitsdatenblatt Synperonic PE®/F68*, <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=DE&language=de&productNumber=81112&brand=FLUKA&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Ffluka%2F81112%3Flang%3Dde> (27.07.2012), **2012**.
- [211] BASF SE - Care Chemicals Division - Pharma Ingredients & Services, *Technical Information: Lutrol® L and Lutrol F-Grades*, http://www.pharma-ingredients.basf.com/Statements/Technical%20Informations/EN/Pharma%20Solutions/03_100102e_Lutrol%20L%20and%20Lutrol%20F-Grades.pdf (27.07.2012), **2010**.
- [212] S. M. Moghimi, A. C. Hunter, *Trends Biotechnol.* **2000**, 18, 412.
- [213] G. Wedler, *Lehrbuch der Physikalischen Chemie, Vol. 5*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2004**.
- [214] P. W. Atkins, J. de Paula, *Physikalische Chemie, Vol. 4*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2006**.
- [215] L. Illum, M. A. Khan, E. Mak, S. S. Davis, *Int. J. Pharm.* **1986**, 30, 17.
- [216] F. Leonard, R. K. Kulkarni, G. Brandes, J. Nelson, J. J. Cameron, *J. Appl. Polym. Sci.* **1966**, 10, 259.
- [217] W. R. Vezin, A. T. Florence, *J. Biomed. Mater. Res.* **1980**, 14, 93.
- [218] F. Leonard, R. K. Kulkarni, J. Nelson, G. Brandes, *J. Biomed. Mater. Res.* **1967**, 1, 3.
- [219] J. Nicolas, P. Couvreur, *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* **2009**, 1, 111.
- [220] C. Vauthier, C. Dubernet, E. Fattal, H. Pinto-Alphandary, P. Couvreur, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2003**, 55, 519.
- [221] W. R. Vezin, A. T. Florence, *J. Pharm. Pharmacol.* **1978**, 30, 5P.
- [222] K. C. Pani, G. Gladieux, G. Brandes, R. K. Kulkarni, F. Leonard, *Surgery* **1968**, 63, 481.
- [223] V. Lenaerts, P. Couvreur, D. Christiaens-Leyh, E. Joiris, M. Roland, B. Rollman, P. Speiser, *Biomaterials* **1984**, 5, 66.
- [224] L. Vansnick, P. Couvreur, D. Christiaens-Leyh, M. Roland, *Pharm. Res.* **1985**, 1, 36.
- [225] K. Langer, E. Seegmüller, A. Zimmer, J. Kreuter, *Int. J. Pharm.* **1994**, 110, 21.
- [226] C. Lherm, R. H. Müller, F. Puisieux, P. Couvreur, *Int. J. Pharm.* **1992**, 84, 13.
- [227] K. H. Wallis, R. H. Müller, *Pharm. Ind.* **1993**, 55, 168.

- [228] R. H. Müller, C. Lherm, J. Herbolt, P. Couvreur, *Biomaterials* **1990**, *11*, 590.
- [229] D. Scherer, J. R. Robinson, J. Kreuter, *Int. J. Pharm.* **1994**, *101*, 165.
- [230] J. Kost, K. Leong, R. Langer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, *86*, 7663.
- [231] A. W. Cooper, P. J. Harris, G. K. Kumar, J. C. Tebby, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1989**, *27*, 1967.
- [232] B. Ryan, G. McCann, *Macromol. Rapid Commun.* **1996**, *17*, 217.
- [233] J. M. Rollet, P. Couvreur, L. Roblot-Treupel, F. Puisieux, *J. Pharm. Sci.* **1986**, *75*, 361.
- [234] J. Kreuter, *Pharm. Acta Helv.* **1983**, *58*, 242.
- [235] S. W. Kim, R. V. Petersen, J. Feijen, *Med. Chem., Academic Press* **1980**, *11*, 193.
- [236] L. Grislain, P. Couvreur, V. Lenaerts, M. Roland, D. Deprez-Decampeneere, P. Speiser, *Int. J. Pharm.* **1983**, *15*, 335.
- [237] J. Kreuter, *Pharm. Acta Helv.* **1983**, *58*, 217.
- [238] V. Lenaerts, J. F. Nagelkerke, T. J. C. Van Berkel, P. Couvreur, L. Grislain, M. Roland, P. Speiser, *J. Pharm. Sci.* **1984**, *73*, 980.
- [239] S. Gibaud, J. P. Andreux, C. Weingarten, M. Renard, P. Couvreur, *Eur. J. Cancer, Part A* **1994**, *30A*, 820.
- [240] C. Chavany, T. L. Doan, P. Couvreur, F. Puisieux, C. Hélène, *Pharm. Res.* **1992**, *9*, 441.
- [241] M. T. Peracchia, E. Fattal, D. Desmaële, M. Besnard, J. P. Noël, J. M. Gomis, M. Appel, J. d'Angelo, P. Couvreur, *J. Controlled Release* **1999**, *60*, 121.
- [242] R. Gref, Y. Minamitake, M. T. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin, R. Langer, *Science* **1994**, *263*, 1600.
- [243] D. Bazile, C. Prud'homme, M.-T. Bassoullet, M. Marlard, G. Spenlehauer, M. Veillard, *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*, 493.
- [244] R. R. Bruns, G. E. Palade, *J. Cell Biol.* **1968**, *37*, 244.
- [245] R. M. Gesler, P. J. Garvin, B. Klammer, R. U. Robinson, C. R. Thompson, W. R. Gibson, F. C. Wheeler, R. G. Carlson, *Bull. Parenter. Drug Assoc.* **1973**, *27*, 101.
- [246] H. G. Schroeder, G. H. Simmons, P. P. DeLuca, *J. Pharm. Sci.* **1978**, *67*, 504.
- [247] J. K. Vasir, M. K. Reddy, V. D. Labhasetwar, *Curr. Nanosci.* **2005**, *1*, 47.
- [248] G. Borchardt, J. Kreuter, *J. Drug Targeting* **1993**, *1*, 15.
- [249] L. Illum, S. S. Davis, *FEBS Lett.* **1984**, *167*, 79.
- [250] L. Illum, S. S. Davis, R. H. Müller, E. Mak, P. West, *Life Sci.* **1987**, *40*, 367.
- [251] S. D. Tröster, U. Müller, J. Kreuter, *Int. J. Pharm.* **1990**, *61*, 85.
- [252] S. D. Tröster, J. Kreuter, *J. Microencapsulation* **1992**, *9*, 19.
- [253] S. L. Illum, S. S. Davis, *J. Pharm. Sci.* **1983**, *72*, 1086.
- [254] L. Illum, I. M. Hunneyball, S. S. Davis, *Int. J. Pharm.* **1986**, *29*, 53.
- [255] S. D. Tröster, J. Kreuter, *Int. J. Pharm.* **1988**, *45*, 91.
- [256] S. D. Tröster, K. H. Wallis, R. H. Müller, J. Kreuter, *J. Controlled Release* **1992**, *20*, 247.
- [257] G. Borchardt, S. Brandriss, J. Kreuter, S. Margel, *J. Drug Targeting* **1994**, *2*, 61.
- [258] T. Blunk, D. F. Hochstrasser, J.-C. Sanchez, B. W. Müller, R. H. Müller, *Electrophoresis* **1993**, *14*, 1382.
- [259] L. Illum, S. S. Davis, C. G. Wilson, N. W. Thomas, M. Frier, J. G. Hardy, *Int. J. Pharm.* **1982**, *12*, 135.
- [260] D. J. Wilkins, *J. Colloid Interface Sci.* **1967**, *25*, 84.
- [261] G. Storm, S. O. Belliot, T. Daemen, D. D. Lasic, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1995**, *17*, 31.
- [262] J. H. Lee, J. Kopecek, J. D. Andrade, *J. Biomed. Mater. Res.* **1989**, *23*, 351.
- [263] A. N. Campbell, E. M. Kartzmark, *Can. J. Chem.* **1960**, *38*, 652.
- [264] A. Apelblat, A. Tamir, M. Wagner, *Fluid Phase Equilib.* **1980**, *4*, 229.

- [265] G. Kamath, G. Georgiev, J. J. Potoff, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 19463.
- [266] BÜCHI Labortechnik GmbH, Essen, *BÜCHI Rotavapor R-220 SE (Reproduced with permission)*, <http://www.buechigmbh.de/Basic.33083.0.html> (16.01.2013), **2013**.
- [267] L. R. Milgrom, *The Colours of Life: An Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds*, Oxford University Press Inc., New York, **1997**.
- [268] W. Schaertl, H. Sillescu, *J. Colloid Interface Sci.* **1993**, *155*, 313.
- [269] M. Wohlgemuth, *Diffusionsexperimente an Nanokapseldispersionen: Größenverteilung, Wirkstofffreisetzung und andere dynamische Phänomene* (Doctoral Thesis), Duisburg-Essen, **2002**.
- [270] S. Beuermann, *Präparation von elektrisch geladenen Polyalkylcyanoacrylat-Nanokapseln zur elektrophoretischen Abscheidung an Oberflächen* (Diploma Thesis), Duisburg-Essen, **2006**.
- [271] J. Linders, *Charakterisierung von Partikeldispersionen mit Methoden der Lichtmikroskopie* (Diploma Thesis), Duisburg-Essen, **2007**.
- [272] C. Finder, *Optische Beobachtung von oberflächengebundenen und frei beweglichen Nanopartikeln* (Doctoral Thesis), Duisburg-Essen, **2005**.
- [273] R. D. Bourke, R. J. Cooling, *Aust. New Zeal. J. Ophthalmol.* **1995**, *23*, 165.
- [274] M. F. Costa Gomes, J. Deschamps, D.-H. Menz, *J. Fluorine Chem.* **2004**, *125*, 1325.
- [275] *CRC HANDBOOK of CHEMISTRY and PHYSICS*, Vol. 55, CRC PRESS, **1974-1975**.
- [276] Mettler-Toledo Intl. Inc., *Magnesium Chloride - Refractometry concentration table (+20°C)*, http://de.mt.com/de/de/home/supportive_content/application_editorials/Magnesium_Chloride_re_e.html (20.07.2012), **2002**.
- [277] N. Maeda, *Jpn. J. Physiol.* **1996**, *46*, 1.
- [278] G. Hagen, *Ann. Phys.* **1839**, *122*, 423.
- [279] J. L. M. Poiseuille, *Recherches expérimentales sur le mouvement des liquides dans les tubes de très petits diamètres*, Bachelier, imprimeur-libraire, Paris, **1841**.
- [280] J. L. M. Poiseuille, *Recherches expérimentales sur le mouvement des liquides dans les tubes de très petits diamètres*, (Paris), **1846**.
- [281] B. Pirofsky, *J. Clin. Invest.* **1953**, *32*, 292.
- [282] U. Windberger, A. Bartholovitsch, R. Plasenzotti, K. J. Korak, G. Heinze, *Exp. Physiol.* **2003**, *88*, 431.
- [283] A. R. Pries, D. Neuhaus, P. Gaehtgens, *Am. J. Physiol.* **1992**, *263*, H1770.
- [284] R. H. Haynes, *Am. J. Physiol.* **1960**, *198*, 1193.
- [285] R. Fåhræus, *Physiol. Rev.* **1929**, *9*, 241.
- [286] J. H. Barbee, G. R. Cokelet, *Microvasc. Res.* **1971**, *3*, 6.
- [287] H. L. Goldsmith, *Microvasc. Res.* **1986**, *31*, 121.
- [288] R. Fåhræus, T. Lindqvist, *Am. J. Physiol.* **1931**, *96*, 562.
- [289] W. Ostwald, *Kolloid Z.* **1925**, *36*, 99.
- [290] W. Ostwald, *Kolloid Z.* **1927**, *43*, 190.
- [291] P. W. Atkins, J. de Paula, in *Physikalische Chemie*, Vol. 4 (Eds.: P. W. Atkins, J. de Paula), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2006**, pp. 737.
- [292] C. Finder, M. Wohlgemuth, C. Mayer, *Part. Part. Syst. Charact.* **2004**, *21*, 372.
- [293] R. O. Wayne, in *Light and Video Microscopy* (Ed.: R. O. Wayne), Academic Press/Elsevier Inc., **2009**, pp. 95.
- [294] J. B. Reade, in *MICROGRAPHIA: CONTAINING Practical Essays ON REFLECTING, SOLAR, OXY-HYDROGEN GAS MICROSCOPES; MICROMETERS; EYE-PIECES, &c. &c.*, Vol. Appendix 2 (Eds.: C. R. Goring, A. Pritchard), WHITTAKER AND CO., AVE-MARIA-LANE, London, **1837**, pp. 227.
- [295] J. T. Queckett, *A PRACTICAL TREATISE ON THE USE OF THE MICROSCOPE*, Vol. 2, H. Bailliere, London, **1852**.

- [296] J. Tyndall, *Six Lectures on Light: Delivered in America in 1872-1873, Vol. 5*, Longman's Green And Co., London, **1895**.
- [297] S. H. Gage, *Trans. Amer. Micros. Soc.* **1920**, 39, 95.
- [298] S. H. Gage, *The Microscope; An Introduction to Microscopic Methods and to Histology, Darkfield edition, Vol. 14*, Comstock Publishing Co., Ithaca, New York, **1925**.
- [299] H. Siedentopf, *Physikal. Z.* **1909**, 10, 778.
- [300] H. Siedentopf, *Colloid Polym. Sci.* **1913**, 12, 68.
- [301] E. Abbe, *Archiv Mikroskop. Anat.* **1873**, 9, 413.
- [302] G. Mie, *Ann. Phys.* **1908**, 330, 377.
- [303] L. Rayleigh, *Proc. R. Soc. London, Ser. A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character* **1907**, 79, 399.
- [304] R. A. Zsigmondy, *Nobel Lecture* **1926**.
- [305] J. Heuberger, *Fortschrittsberichte über Kolloide und Polymere* **1928**, 26, 230.
- [306] A. Einstein, *Ann. Phys.* **1905**, 322, 549.
- [307] BTA Sabine Barnert, *Persönliche Mitteilung*, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie Prof. Dr. Rolf Schubert, **2010**.
- [308] A. F. Holleman, E. Wiberg, *Lehrbuch der anorganischen Chemie, Vol. 101*, Walter de Gruyter & Co., Berlin, **1995**.
- [309] B. W. Atwater, *J. Fluoresc.* **1992**, 2, 237.
- [310] W. L. Rumsey, J. M. Vanderkooi, D. F. Wilson, *Science* **1988**, 241, 1649.
- [311] J. M. Vanderkooi, G. Maniara, T. J. Green, D. F. Wilson, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 5476.
- [312] J. M. Vanderkooi, W. W. Wright, M. Erecinska, *Biochemistry* **1990**, 29, 5332.
- [313] A. Sharma, O. S. Wolfbeis, *Appl. Spectrosc.* **1988**, 42, 1009.
- [314] N. Opitz, D. W. Lübbers, *Int. Anesthesiol. Clinic.* **1987**, 25, 177.
- [315] S. W. Hell, *Science* **2007**, 316, 1153.
- [316] M. G. L. Gustafsson, *J. Microsc.-Oxford* **2000**, 198, 82.
- [317] K. Weisshart, Y. Novikau, G. Krampert, M. Kempe, *Optik & Photonik* **2010**, 5, 40.
- [318] W. Lukosz, M. Marchand, *Optica Acta: Int. J. Optics* **1963**, 10, 241.
- [319] R. Heintzmann, T. M. Jovin, C. Cremer, *J. Opt. Soc. Am. A-Opt. Image Sci. Vis.* **2002**, 19, 1599.
- [320] R. Heintzmann, G. Ficiz, *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* **2006**, 5, 289.
- [321] M. G. L. Gustafsson, D. A. Agard, J. W. Sedat, *J. Microsc.* **1999**, 195, 10.
- [322] M. G. L. Gustafsson, J. W. Sedat, D. A. Agard, *METHOD AND APPARATUS FOR THREE-DIMENSIONAL MICROSCOPY WITH ENHANCED RESOLUTION*, US RE38,307 E, The Regents of the University of California, Oakland, CA (US), **2003**.
- [323] M. G. L. Gustafsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, 102, 13081.
- [324] M. G. L. Gustafsson, L. Shao, P. M. Carlton, C. J. R. Wang, I. N. Golubovskaya, W. Z. Cande, D. A. Agard, J. W. Sedat, *Biophys. J.* **2008**, 94, 4957.
- [325] E. Chung, D. K. Kim, P. T. C. So, *Opt. Lett.* **2006**, 31, 945.
- [326] S. W. Hell, J. Wichmann, *Opt. Lett.* **1994**, 19, 780.
- [327] S. W. Hell, M. Schrader, H. T. M. van der Voort, *J. Microsc.* **1997**, 187, 1.
- [328] S. W. Hell, A. Schönle, A. Van den Bos, in *Science of Microscopy* (Eds.: P. W. Hawkes, J. C. H. Spence), Springer-Verlag New York, **2007**, pp. 790.
- [329] M. Ed. Michael Bachmann, *Persönliche Mitteilung*, Universität Karlsruhe, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Zoologisches Institut, Lehrstuhl für Zell- und Neurobiologie Prof. Dr. Martin Bastmeyer, **2012**.
- [330] B. M. Fung, *Org. Magn. Reson.* **1983**, 21, 397.
- [331] M. P. Krafft, J. G. Riess, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 1714.

- [332] Dipl.-Chem. Stefan Graß, *Persönliche Mitteilung*, Universität Duisburg-Essen, Institut für Physikalische Chemie, Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. h.c. Reinhard Zellner, **2013**.
- [333] G. Socrates, *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies - Tables and Charts, Vol. 3*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, **2001**.
- [334] B. Taylor, *Methodus Incrementorum Directa & Inversa*, Inny, **1717**.
- [335] R. G. Dickinson, R. T. Dillon, F. Rasetti, *Phys. Rev.* **1929**, 34, 582.
- [336] A. R. Davis, B. G. Oliver, *J. Solution Chem.* **1972**, 1, 329.
- [337] B. Schrader, *Infrared and Raman Spectroscopy - Methods and Applications*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, **1995**.
- [338] C. F. Windisch, V.-A. Glezakou, P. F. Martin, B. P. McGrail, H. T. Schaef, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, 14, 2560.
- [339] J. Kiefer, T. Seeger, S. Steuer, S. Schorsch, M. C. Weikl, A. Leipertz, *Meas. Sci. Technol.* **2008**, 19, 085408.
- [340] J. G. Riess, M. Le Blanc, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1978**, 17, 621.
- [341] F2 Chemicals Ltd., Lea Lane, Lea Town, Preston, UK, *Safety Data Sheet of cis-, trans-Perfluorodecalin, CAS number 306-94-5*, **2008**.
- [342] J. Lutz, G. Herrmann, *Pflug. Arch. Eur. J. Phy.* **1984**, 401, 174.
- [343] R. Ahlrichs, M. Bär, M. Häser, H. Horn, C. Kölmel, *Chem. Phys. Lett.* **1989**, 162, 165.
- [344] PD Dr. habil. Holger Somnitz, *Persönliche Mitteilung*, Institut für Theoretische Chemie, Universität Duisburg-Essen, **2013**.
- [345] *Der Landolt-Börnstein IV/17: Static Dielectric Constants of Pure Liquids and Binary Liquid Mixtures: Dielectric constant of perfluorodecaline*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2008**.
- [346] N. V. Lifanova, T. M. Usacheva, V. I. Zhuravlev, *Zh. Fiz. Khim.* **1992**, 66, 237.
- [347] H. Schimassek, *Biochem. Z.* **1963**, 336, 460.
- [348] H. J. Hohorst, F. H. Kreutz, T. Bücher, *Biochem. Z.* **1959**, 332, 18.
- [349] J. S. Nisselbaum, S. Green, *Anal. Biochem.* **1969**, 27, 212.
- [350] H. W. Heldt, N. Greif, M. Klingenberg, R. Scholz, U. Panten, J. Grunst, T. Bücher, *J. Biol. Chem.* **1965**, 240, 4659.
- [351] G. E. Glock, P. McLean, *Biochem. J.* **1955**, 61, 388.
- [352] Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. H. de Groot, Institut für Physiologische Chemie, Universitätsklinikum Essen, *Standardvorgehensweise Leberperfusion*, **2010** (unveröffentlichtes Material).
- [353] Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. H. de Groot, Institut für Physiologische Chemie, Universitätsklinikum Essen, *Präsentationen und gedanklicher Austausch innerhalb von Arbeitsgruppentreffen*, **2010-2012** (unveröffentlichtes Material).
- [354] C. Stephan, C. Schlawne, J. Bauer, M. Zähres, I. Waack, T. Bramey, F. Petrat, M. Kirsch, H. de Groot, C. Mayer, *Development of nanoerythrocytes*, CeNIDE (CENTER FOR NANOINTEGRATION DUISBURG-ESSEN)-Beirats- und Mitgliedertreffen, **2010** (Poster).
- [355] R. E. Wells, E. W. Merrill, *J. Clin. Invest.* **1962**, 41, 1591.
- [356] H. B. Lee, M. D. Blaufox, *J. Nucl. Med.* **1985**, 26, 72.
- [357] C. Popp-Snijders, J. A. Schouten, W. J. van Blitterswijk, E. A. van der Veen, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Biomembranes* **1986**, 854, 31.
- [358] B. A. C. van Acker, H. J. G. Bilo, C. Popp-Snijders, H. van Bronswijk, P. L. Oe, A. J. M. Donker, *Nephrol. Dial. Transplant.* **1987**, 2, 557.
- [359] G. von Hüfner, *Z. Physiol. Chem.* **1877**, 1, 317.
- [360] E. Betz, K. Reutter, D. Mecke, H. Ritter, in *Biologie des Menschen, Vol. 15* (Eds.: Mörike, Betz, Mergenthaler), Quelle & Meyer Verlag GmbH & Co., Wiebelsheim, **2001**, pp. 259.

8. Anhang

8.1 Chemikalien- und Geräteliste

Tab. 6: Chemikalienliste.

Chemikalie	Reinheit	Hersteller
<i>cis</i> -, <i>trans</i> -Perfluorodecalin, (58 % <i>cis</i> -Isomer, 42 % <i>trans</i> -Isomer), CAS-Nr. 306-94-5	97 %	fluorochem Ltd., UK
Dichlormethan p.a.	99,99 %	Fisher Scientific
Aceton p.a.	99,98 %	Fisher Scientific
Ethanol p.a.	99,9 %	AnalaR Normapur [®] von VWR [®]
Indermil [®]	> 80-100 %	Henkel [®]
Synperonic [®] PE/F68	-	Sigma-Aldrich [®]
Lutrol [®] L44	-	BASF
Lutrol [®] F68	-	BASF
Lutrol [®] F87	-	BASF
Lutrol [®] F108	-	BASF
Wasser, deionisiert (Ionenaustauscheranlage)	elektrische Leitfähigkeit $\sigma = 0,7-0,9 \mu\text{Scm}^{-1}$	Universität Duisburg-Essen
Magnesium(II)chlorid Hexahydrat p.a.	99 %	Acros Organics
Octadecyltrichlorsilan	$\geq 90\%$	Sigma-Aldrich [®]
Immersionsöl	für die Mikroskopie, $d_4^{20} 1.025$ $n_D^{20} 1.516$	Fluka
5,10,15,20- Tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin, CAS-Nr. 25440-14-6	approx. 90,0-95,0 %	Sigma-Aldrich [®]
5,10,15,20-Tetrakis(pentafluorophenyl)- 21 <i>H</i> ,23 <i>H</i> -Porphin Palladium(II), CAS-Nr. 72076-09-6	-	Sigma-Aldrich [®]
5,10,15,20-Tetrakis(pentafluorophenyl)- 21 <i>H</i> ,23 <i>H</i> -Porphin Platin(II), CAS-Nr. 109781-47-7	-	Frontier Scientific
5,10,15,20-Tetrakis(pentafluorophenyl)- 21 <i>H</i> ,23 <i>H</i> -Porphyrin Eisen(III)chlorid, CAS-Nr. 36965-71-6	$\geq 95,0 \%$	Sigma-Aldrich [®]
Mowiol [®] -Einbettmischung	-	KIT Karlsruhe, AK Bastmeyer
KH-Puffer	-	Universitätsklinikum Essen, Physiologische Chemie, AK H. de Groot

Tab. 7: Geräteliste.

Gerät	Modell/Bautyp, Hersteller
Rotationsverdampfer	Rotavapor 110, Fa. BÜCHI GmbH Pumpe Vacuubrand CVC 2, Fa. Vacuubrand GmbH & Co., Wertheim Bad, Fa. Labor-Schoeps
Rotationsverdampfer	Rotavapor R-153, Fa. BÜCHI GmbH Vakuum-System B-172, Fa. BÜCHI GmbH Vakuum-/Destillationskontrolleinheit B-168, Fa. BÜCHI GmbH Kühler DFK 2000 A, Fa. colora
UV/Vis-Spektrometer	Lambda 950, Fa. Perkin Elmer STD-Detektormodul
UV Einmal-Küvetten	ULTRA Micro-Cell, Fa. Ocean Optics, Inc.
NMR-Spektrometer	DRX 500, Fa. Bruker
Dunkelfeldmikroskop mit <i>Nanoparticle Tracking (DNM)</i>	Dunkelfeldmikroskop mit <i>Dynamic Nanosizing Microscopy (DNM)</i> : Dunkelfeldmikroskop Biolar, Fa. PZO, Polen Kardioidkondensor Apertur N _A 1.2-1.4, Ölimmersion, Fa. PZO, Polen Objektiv Apertur N _A 0.75, 40-fache Vergrößerung, Wasser-immersion, achromatisch, ЛОМО 250 W-Halogenlampe, Fa. Osram CCD-Kamera KP-F1 E/K, Fa. Hitachi Framegrabberkarte Oculus F/64-DSP, Fa. Coreco Bildverarbeitungssoftware PicColor 3.3, Fa. Fibus Windows-basierter PC mit Microsoft Excel- und Origin [®] -Analyse- und Auswertesoftware
Dunkelfeldmikroskop mit <i>Nanoparticle Tracking (ANT)</i>	Dunkelfeldmikroskop mit <i>Advanced Nanoparticle Tracking (ANT)</i> : Dunkelfeldmikroskop, Fa. Leitz Kardioidkondensor UV 1.2-1.4, Ölimmersion, Fa. TIYODA Objektiv 170/0.17 Pl 40/0.65, Fa. Leitz 100 W-Halogenlampe Typ MTR 27, Fa. Wild Heerbrugg Kamera FireWire-CAM-011H, Fa. PHYTEC Linux-basierter PC mit C-, GTK+-, unicap- und GSL-basierter Analyse- und Auswertesoftware

8.2 Ergebnisübersichten

Die nachfolgenden Tabellen dienen der Übersicht der in dieser Arbeit aufgeführten und besprochenen Ergebnisse. Die Standardsynthese ist mit Nr. 1 gekennzeichnet und die diesbezüglichen Ergebnisse sind grün unterlegt.

Tab. 8: Übersicht der Ergebnisse mit Variation des Molenbruchs in der organischen Phase.

Molenbruch der organischen Phase		hydrodynamischer Radius \pm Standardabweichung [nm]	Bestimmtheitsmaß R^2
Nr. 2	0,02280	199 \pm 36	0,97976
	0,04450	161 \pm 29	0,99051
	0,06530	151 \pm 23	0,99164
	0,08520	157 \pm 24	0,98481
	0,09800	191 \pm 31	0,99083
nach 28 Tagen	0,09800	254 \pm 59	0,93496
	0,10430	164 \pm 25	0,99589
	0,11660	164 \pm 30	0,99250
Nr. 1	0,12850	154 \pm 28	0,98912
	0,13580	195 \pm 36	0,98680
nach 28 Tagen	0,13580	220 \pm 45	0,96153
	0,14590	153 \pm 23	0,99543
	0,15560	180 \pm 33	0,98825
	0,16790	187 \pm 31	0,99167
	0,17850	221 \pm 37	0,98880
	0,18890	229 \pm 51	0,97329
	0,19900	281 \pm 65	0,95869
nach 28 Tagen	0,19900	403 \pm 147	0,81858
	0,20880	282 \pm 71	0,97496
	0,21840	276 \pm 60	0,96975
nach 28 Tagen	0,21840	330 \pm 95	0,93955
	0,22780	367 \pm 67	0,98161
Nr. 3	0,23800	136 \pm 19	0,92017
Nr. 3	0,23800	495 \pm 193	0,92017
	0,24800	277 \pm 68	0,98141
	0,25890	408 \pm 121	0,92088
	0,26730	330 \pm 124	0,89839
	0,26930	108 \pm 14	0,95065
	0,27140	130 \pm 21	0,97402
	0,27350	127 \pm 17	0,94441
Nr. 4	0,27550	122 \pm 15	0,94056
Nr. 4	0,27550	337 \pm 113	0,94056
	0,27760	115 \pm 18	0,97226
	0,28750	121 \pm 21	0,97698

Tab. 9: Übersicht der Ergebnisse mit Variation des Molenbruchs in der wässrigen Phase.

Molenbruch der wässrigen Phase		hydrodynamischer Radius \pm Standardabweichung [nm]	Bestimmtheitsmaß R^2
	0,66260	149 \pm 28	0,92885
	0,67020	119 \pm 14	0,97190
	0,68430	159 \pm 35	0,94104
	0,69720	139 \pm 27	0,96910
	0,71480	139 \pm 29	0,98599
Nr. 6	0,72020	136 \pm 24	0,95599
Nr. 5	0,73040	407 \pm 132	0,88063
	0,74440	446 \pm 125	0,93364
	0,75300	448 \pm 113	0,93616
nach 28 Tagen	0,75300	547 \pm 156	0,83462
	0,76100	331 \pm 84	0,96073
	0,77200	310 \pm 78	0,95623
	0,78210	412 \pm 129	0,92759
	0,79140	276 \pm 63	0,96533
nach 28 Tagen	0,79140	321 \pm 80	0,92520
	0,80250	253 \pm 47	0,95417
	0,81250	226 \pm 38	0,99259
	0,82160	233 \pm 39	0,98774
	0,83180	211 \pm 33	0,98585
nach 28 Tagen	0,83180	245 \pm 57	0,84715
	0,84250	208 \pm 40	0,99156
	0,85200	184 \pm 35	0,98673
	0,86170	201 \pm 33	0,99425
Nr. 1	0,87150	154 \pm 28	0,98912
	0,88160	179 \pm 31	0,98409
	0,89120	210 \pm 32	0,98622
	0,90140	188 \pm 33	0,90714
	0,91150	208 \pm 32	0,98675
	0,92140	198 \pm 29	0,97723
	0,93130	215 \pm 32	0,98455
	0,94160	203 \pm 27	0,97985
	0,95140	200 \pm 33	0,92649
	0,96180	229 \pm 31	0,96658
	0,97130	190 \pm 40	0,93742
	0,98140	203 \pm 29	0,91936
Nr. 7	0,99140	236 \pm 40	0,91256

Tab. 10: Übersicht der Ergebnisse mit Variation der PFD-Konzentration ohne und mit angepasster Monomerkonzentration.

Zeit	PFD [μL]	Monomer [μL]	hydrodynamischer Radius \pm Standardabweichung [nm]	Bestimmtheitsmaß R^2
direkt nach der Synthese	200	10	180 ± 30	0,98878
direkt nach der Synthese	200	10	199 ± 34	0,97546
nach 14 Tagen			219 ± 44	0,96746
nach 28 Tagen			247 ± 70	0,94094
nach 42 Tagen			240 ± 65	0,92749
direkt nach der Synthese	300	10	190 ± 25	0,98259
nach 14 Tagen			236 ± 39	0,98502
nach 28 Tagen			252 ± 74	0,83402
nach 42 Tagen			317 ± 73	0,89552
direkt nach der Synthese	400	10	183 ± 31	0,98851
nach 14 Tagen			232 ± 34	0,97243
nach 28 Tagen			269 ± 80	0,85153
nach 42 Tagen			360 ± 87	0,94655
direkt nach der Synthese	300	15	199 ± 32	0,98400
nach 14 Tagen			216 ± 39	0,95650
nach 28 Tagen			212 ± 50	0,95220
nach 42 Tagen			261 ± 71	0,94219
direkt nach der Synthese	400	20	216 ± 32	0,99336
nach 14 Tagen			244 ± 47	0,88268
nach 28 Tagen			226 ± 69	0,94362
nach 42 Tagen			260 ± 81	0,93344

Tab. 11: Übersicht der Ergebnisse mit Absenz der Lösungsmittel.

Lösungsmittelvariation	hydrodynamischer Radius \pm Standardabweichung [nm]		Bestimmtheitsmaß R^2
Standardansatz	direkt nach der Synthese	199 ± 34	0,97546
	nach 14 Tagen	219 ± 44	0,96746
	nach 28 Tagen	247 ± 70	0,94094
	nach 42 Tagen	240 ± 65	0,92749
Standardansatz ohne Dichlormethan	direkt nach der Synthese	196 ± 42	0,90990
	nach 14 Tagen	200 ± 32	0,99041
	nach 28 Tagen	230 ± 63	0,95249
	nach 42 Tagen	221 ± 60	0,97310
Standardansatz ohne Aceton	direkt nach der Synthese	200 ± 43	0,94333
	nach 14 Tagen	205 ± 41	0,97028
	nach 28 Tagen	220 ± 52	0,95774
	nach 42 Tagen	214 ± 69	0,96793

Tab. 12: Übersicht der Ergebnisse mit Tensidreduzierung.

Tensidreduzierung		hydrodynamischer Radius \pm Standardabweichung [nm]	Bestimm- theitsmaß R ²
100 % Synperonic® PE/F68	direkt nach der Synthese	199 \pm 34	0,97546
	nach 14 Tagen	219 \pm 44	0,96746
	nach 28 Tagen	247 \pm 70	0,94094
75 % Synperonic® PE/F68 in der wässrigen Phase	direkt nach der Synthese	159 \pm 22	0,99264
	nach 14 Tagen	203 \pm 33	0,98801
	nach 28 Tagen	222 \pm 38	0,99122
50 % Synperonic® PE/F68 in der wässrigen Phase	direkt nach der Synthese	178 \pm 30	0,99298
	nach 14 Tagen	200 \pm 37	0,98751
	nach 28 Tagen	216 \pm 43	0,95438
25 % Synperonic® PE/F68 in der wässrigen Phase	direkt nach der Synthese	167 \pm 34	0,98325
	nach 14 Tagen	206 \pm 36	0,98546
	nach 28 Tagen	237 \pm 56	0,97537
12,5 % Synperonic® PE/F68 in der wässrigen Phase	direkt nach der Synthese	177 \pm 30	0,99066
	nach 14 Tagen	194 \pm 35	0,99045
	nach 28 Tagen	233 \pm 44	0,96681
0 % Synperonic® PE/F68 in der organischen Phase	direkt nach der Synthese	177 \pm 23	0,99041
	nach 14 Tagen	203 \pm 31	0,98721
	nach 28 Tagen	206 \pm 41	0,97703

Tab. 13: Übersicht der Ergebnisse mit Tensidaustausch.

Tensidaustausch		hydrodynamischer Radius \pm Standardabweichung [nm]	Bestimmtheitsmaß R^2
100 % Synperonic® PE/F68	direkt nach der Synthese	199 \pm 34	0,97546
	nach 14 Tagen	219 \pm 44	0,96746
	nach 28 Tagen	247 \pm 70	0,94094
100 % Lutrol® L44	direkt nach der Synthese	158 \pm 26	0,99368
	nach 14 Tagen	201 \pm 37	0,99278
	nach 28 Tagen	218 \pm 40	0,97708
100 % Lutrol® F68	direkt nach der Synthese	162 \pm 25	0,99917
	nach 14 Tagen	225 \pm 38	0,98086
	nach 28 Tagen	213 \pm 41	0,98941
100 % Lutrol® F87	direkt nach der Synthese	172 \pm 24	0,98296
	nach 14 Tagen	204 \pm 33	0,99303
	nach 28 Tagen	201 \pm 38	0,99088
100 % Lutrol® F108	direkt nach der Synthese	169 \pm 23	0,99555
	nach 14 Tagen	204 \pm 33	0,99640
	nach 28 Tagen	220 \pm 39	0,98435

Tab. 14: Übersicht der Ergebnisse mit Variation der Temperatur.

Temperaturvariation		hydrodynamischer Radius \pm Standardabweichung [nm]	Bestimmtheitsmaß R^2
	5 °C	135 \pm 30	0,98978
Standardansatz	23 °C	180 \pm 30	0,98878
	30 °C	192 \pm 24	0,96692
	40 °C	193 \pm 31	0,97204

Tab. 15: Übersicht der Ergebnisse mit Hochskalierung des Ansatzvolumens.

Hochskalierung		hydrodynamischer Radius \pm Standardabweichung [nm]	Bestimmtheitsmaß R^2
Standardansatz	direkt nach der Synthese	199 ± 34	0,97546
	nach 14 Tagen	219 ± 44	0,96746
	nach 28 Tagen	247 ± 70	0,94094
	nach 42 Tagen	240 ± 65	0,92749
	nach 56 Tagen	269 ± 77	0,89113
10-fach hochskalierter Ansatz	direkt nach der Synthese	172 ± 22	0,98765
	nach 14 Tagen	207 ± 39	0,98656
	nach 28 Tagen	227 ± 53	0,97058
	nach 42 Tagen	268 ± 62	0,95459
	nach 56 Tagen	306 ± 79	0,95480
10-fach hochskalierter Ansatz beschleunigter Langzeit- stabilitätstest bei 60 °C	direkt nach der Synthese	202 ± 37	0,83938
	nach 2 Stunden	213 ± 45	0,93932
	nach 4 Stunden	217 ± 45	0,90845
	nach 6 Stunden	211 ± 51	0,81521
	nach 24 Stunden	268 ± 63	0,91024
	nach 96 Stunden	327 ± 71	0,81254
	nach 168 Stunden	350 ± 102	0,64330
20-fach hochskalierter Ansatz	direkt nach der Synthese	177 ± 31	0,99610
	nach 14 Tagen	209 ± 39	0,98420
	nach 28 Tagen	227 ± 51	0,97743
	nach 42 Tagen	274 ± 57	0,97215
	nach 56 Tagen	272 ± 68	0,94066
40-fach hochskalierter Ansatz	direkt nach der Synthese	177 ± 33	0,98988
	nach 14 Tagen	202 ± 39	0,99442
	nach 28 Tagen	245 ± 57	0,93812
	nach 42 Tagen	251 ± 52	0,97461
	nach 56 Tagen	265 ± 64	0,96432

Tab. 16: Übersicht der Ergebnisse der intravenösen Infusionen und Leberperfusionen.

Intravenöse Infusionen		hydrodynamischer Radius \pm Standardabweichung [nm]	Bestimmtheitsmaß R^2
1. Ansatz		242 ± 36	0,98825
2. Ansatz		231 ± 37	0,99368
Leberperfusion		hydrodynamischer Radius \pm Standardabweichung [nm]	Bestimmtheitsmaß R^2
vor Perfusion	A	258 ± 55	0,94366
	B	256 ± 60	0,92317
	C	257 ± 61	0,93810
nach Perfusion	nach 0 min	280 ± 75	0,93283
	nach 30 min	266 ± 63	0,93568
	nach 60 min	257 ± 60	0,92523
	nach 120 min	258 ± 60	0,92804
	nach 180 min	246 ± 57	0,92942
Leberperfusion		hydrodynamischer Radius \pm Standardabweichung [nm]	Bestimmtheitsmaß R^2
direkt nach 30 min Perfusion		169 ± 49	0,98777
bei -20 °C 21 Tage nach Perfusion		185 ± 54	0,99100

9. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.